

Aus der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie  
Geschäftsführende Direktorin: Prof. Dr. med. Susanne Fuchs

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg  
GmbH, Standort Marburg

# **Ti6Al-7Nb-ODH im Vergleich zu anderen biomedizinischen Werkstoffen**

**Eine komparative Analyse unter Anwendung einer humanen  
Knochenmarkszellkultur**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Medizin der  
Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt

von  
**Ralph-Thorsten Nagel**  
aus Essen

Marburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg  
am 23.11.2006

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch  
Referent: Prof. Dr. Dr. A. Wilke  
Korreferent: PD. Dr. R. Stiletto

*„Wir lassen nie vom Suchen ab, und doch, am Ende allen unseren Suchens, sind wir am Ausgangspunkt zurück und werden diesen Ort zum ersten Mal erfassen“.*

(T.S. Eliot)

**Diese Arbeit ist meiner Familie Katrin, Emma und Carl Nagel gewidmet.**

**Ti6Al-7Nb-ODH im Vergleich zu anderen  
biomedizinischen Werkstoffen**

**Eine komparative Analyse unter Anwendung einer humanen  
Knochenmarkszellkultur**

von

**Ralph-Thorsten Nagel**

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Biomaterialien</b>	1
<b>1.2 Biokompatibilität</b>	2
<b>1.3 Versuche zur Biomaterialientestung</b>	3
1.3.1 Tierversuche	3
1.3.2 Zellkultur	3
1.3.3 Die humane Knochenmarkszellkultur	6
1.3.4 Wachstumsfaktoren	6
<b>1.4 Anforderungen an orthopädisch genutzte Implantate</b>	7
<b>1.5 Grundlagen für das Einwachsen von Knochengewebe in die Implantat-         oberfläche (bone ingrowth)</b>	8
1.5.1 Extrazelluläre Matrix	9
<b>1.6 Ziel der vorliegenden Arbeit</b>	10
 <b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	 <b>14</b>
<b>2.1 Rasterelektronenmikroskopie der Werkstoffe</b>	21
<b>2.2 Energiedispersive Röntgenanalyse (REM-EDX)</b>	22
<b>2.3 Das Nährmedium für die humane Knochenmarkszellkultur</b>	22
<b>2.4 Die humane Knochenmarkszellkultur</b>	23
2.4.1 Aussaat von humanen Knochenmarkszellen auf die Testmaterialien	26
<b>2.5 Methoden zur Analyse der Zellmorphologie, des Wachstumsverhaltens         und der Differenzierungstendenz der humanen Knochenmarkszellen         nach Kultivierung</b>	26
2.5.1 Vorbereitung der Biomaterialien mit humanen Knochenmarkszellen zur Rasterelektronenmikroskopie	27
2.5.2 Zellzählung nach Hämatoxylin Färbung mit Hilfe des OPTIMAS- Systems	27
2.5.3 Test der Zellvitalität durch Acridin-Orange Färbung	28
2.5.4 Auflichtmikroskopie nach Immunfluoreszenz -bzw. Alternativfärbung	28
2.5.4.1 Immunfluoreszenzfärbung	28
2.5.4.2 Färbung mit einem Neu-Fuchsin Antikörper	28
2.5.4.3. Färbung mit einem OCG-4 Antikörper als Osteokalzinmarker	29

2.5.5	Aufbereitung der Probenkörper für die FACS-Analyse	30
2.5.6	Auswertung mit dem FACS-Gerät	30
2.5.7	Langzeitkultivierung von humanen Knochenmarkszellen	31
2.5.7.1	Antikörperfärbungen gegen CD-14 positive Zellen	31
2.5.7.2	Nachweis von Alkalischer Phosphatase ohne bzw. nach Stimulation mit Vitamin D <sub>3</sub>	31
2.5.7.3	Antikörperfärbung zur Detektion von Osteokalzin-positiven Zellen	32
2.5.7.4	Modifizierte von Kossa-Versilberung zum Nachweis mineralisierter Gewebeanteile	32
2.5.7.5	Modifizierte Movat Pentachrom-Färbung zur Darstellung chondraler Ossifikationsstadien	32
<b>2.6</b>	<b>Nachweis von Bestandteilen der Extrazellulären Matrix mittels Dot-Blot Verfahren</b>	<b>33</b>
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellzählung nach Hämatoxylin Färbung mit Hilfe des OPTIMAS-Systems</b>	<b>38</b>
<b>3.2</b>	<b>Test der Zellvitalität durch Acridin-Orange Färbung</b>	<b>45</b>
<b>3.3</b>	<b>Durchflußzytometrie mittels FACS (Fluorescence Analysis Cell Sorter)</b>	<b>45</b>
3.3.1	Kontrollkultur auf kultivierten Deckgläschen	46
3.3.2	Vitalität	49
3.3.2.1	T-Lymphozyten (CD 2)	50
3.3.2.2	Monozyten (CD 14)	51
3.3.2.3	Granulozyten (CD 15)	52
3.3.2.4	B-Lymphozyten (CD 19)	54
3.3.2.5	Osteokalzin	55
<b>3.4</b>	<b>Rasterelektronenmikroskopie der mit Knochenmarkszellen kultivierten Biomaterialien</b>	<b>56</b>
3.4.1	Hydroxylapatitkeramik	56
3.4.2	Reintitan	57
3.4.3	Ti6Al7Nb-ODH (Tribosul)	57
3.4.4	Polyäthylen	58
<b>3.5</b>	<b>Langzeitkultivierung von humanen Knochenmarkszellen</b>	<b>59</b>
<b>3.6</b>	<b>Dot-Blot</b>	<b>61</b>

<b>4. DISKUSSION</b>	<b>74</b>
<b>4.1 Die humane Knochenmarkszellkultur zur Biokompatibilitätstestung</b>	<b>75</b>
<b>4.2 Bewertung der Ergebnisse</b>	<b>78</b>
4.2.1 Test der Zellvitalität durch Acridin-Orange Färbung	78
4.2.2 Immunhistologischer Nachweis leukozytärer und osteoblastärer Strukturen auf den Materialoberflächen durch Auflichtmikroskopie	79
4.2.3 Durchflußzytometrie mittels FACS (Fluorescence Analysis Cell Sorter)	80
4.2.4 Langzeitkultivierung von humanen Knochenmarkszellen	82
4.2.5 Dot-Blot	83
<b>4.3 Die getesteten Biomaterialien</b>	<b>84</b>
4.3.1 Hydroxylapatitkeramik	85
4.3.2 Reintitan	88
4.3.3 Ti6Al7Nb-ODH	90
4.3.4 Polyäthylen	92
<b>4.4 Schlußbetrachtung</b>	<b>93</b>
<b>4.5 Ziele zellkultureller Experimente</b>	<b>96</b>
 <b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	 <b>98</b>
 <b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	 <b>100</b>
 <b>Anhang</b>	 <b>120</b>
 <b>Verzeichnis der akademischen Lehrer</b>	 <b>121</b>
 <b>Danksagung</b>	 <b>122</b>

## **1. Einleitung**

Am Anfang eines neuen Jahrtausend stehen mehr als je zuvor rasante technische Entwicklung, innovativer Fortschritt sowie wissenschaftliche Erkenntnis im Mittelpunkt menschlichen Handelns.

Daraus resultierend hat sich in der jüngsten Geschichte der medizinischen Forschung eine Entwicklung abgezeichnet, die vorrangig, neben der Prävention und aktiven Intervention gegen vital bedrohende Erkrankungen, die Verbesserung bzw. Konsolidierung vorhandener Lebensqualität, die daraus resultierende Steigerung des Lebensalters und damit verbunden ein aktives Vorgehen gegen durch Alterungsprozesse hervorgerufene Einschränkungen physiologischer Körperfunktionen zum Ziel hat.

Neben diesen natürlichen Abnutzungsprozessen stellen überdies Verletzungsrisiken bedingt durch ein verändertes Freizeitverhalten sowie eine drastische Zunahme des Straßenverkehrs verbunden mit entsprechenden Gefahren neue Anforderungen an die moderne operative Medizin.

Ein Beispiel hierfür liefert die endoprothetische Orthopädie, die durch Einsatz exogener Werkstoffe als Knochen- beziehungsweise Gelenkersatz selbst bei solchen Schädigungen, die zum Beispiel mit Invalidität bei Gelenkerkrankungen und Gelenkschäden einhergehen, zu einem nahezu beschwerdefreien Leben führt.

### **1.1 Biomaterialien**

Der Einsatz solcher, als Biomaterial bezeichneter exogener Werkstoffe erfolgte zum ersten Mal zu Beginn des 19. Jahrhunderts in der Form, daß Metallschrauben zur Stabilisierung von Knochenfrakturen eingesetzt wurden (Bell, 1804; Levert, 1829).

Mittlerweile handelt es sich bei Biomaterialien keinesfalls mehr nur um metallene Werkstoffe. In letzter Zeit sind zahlreiche unterschiedliche Materialien entwickelt worden. Ferner hat sich, ausgehend von der traumatologischen Chirurgie, der Einsatz solcher exogener Werkstoffe auch auf andere Teilbereiche der Medizin erstreckt.

Dies berücksichtigend, läßt sich das Charakteristikum eines Biomaterial beschreiben als eine Substanz oder eine Kombination von Substanzen mit Ausnahme der Medikamente, die synthetischen oder natürlichen Ursprungs ist und für jeden möglichen Zeitraum als



Ganzes oder Teil eines Behandlungssystems irgendein Gewebe, ein Organ oder eine Körperfunktion behandelt oder ersetzt (Williams, 1988).

Als ein Biomaterial ist demnach ein Stoff anzusehen, welcher in Kontakt mit menschlichen Zellen, Geweben oder Körperflüssigkeiten steht. Dies beinhaltet chirurgische Implantate, Dentalimplantate, Verbände und Materialien der Prothetik genauso wie etwa Materialien in extrakorporalen Kreisläufen oder Blutbeutelsystemen (Lee, 1988).

So finden z.B. Teflon, Gore-Tex oder Polyurethan Anwendung als Gefäßprothese oder Nahtmaterial; Kunststoffe wie Polyäthylen oder Polysulfon fungieren als Gelenkpfannenersatz oder zur Osteosynthese, während Metalle wie Titan und dessen Legierungen oder rostfreier Stahl ihren Einsatz als Endoprothese oder Gelenkersatz finden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich vorrangig mit derartigen Varianten von Biomaterialien, welche ihre Anwendung als orthopädisch relevante Implantate finden.

## **1.2 Biokompatibilität**

Hauptaugenmerk bei der Auswahl geeigneter Materialien für endoprothetische Implantate ist auf deren Verträglichkeit mit dem Empfängergewebe zu legen, insbesondere, weil gerade in der orthopädischen Endoprothetik von einer möglichst langen Verweildauer des Implantates im menschlichen Körper auszugehen ist.

An dieser Stelle kommt erstmalig die Definition der Biokompatibilität zum Tragen, unter der man die Fähigkeit eines Materials versteht, bei spezifischer Applikation eine angemessene Gewebereaktion des Empfängers zu erzeugen (Williams, 1988). Dies beinhaltet, daß ein Biomaterial weder toxisch, noch kanzerogen oder mutagen auf den Organismus wirkt. Ferner muß es im Falle von Gewebeimplantaten adhäsiv für Zellen sein und darf keine Sensibilisierung hervorrufen (Kawahara, 1985). Idealerweise ist ein Biomaterial als "bioinert" zu bezeichnen. In diesem Fall sind, bis auf eine fibröse Abkapselung, keinerlei Reaktionsprodukte im Hinblick auf eine Abstoßung bei Kontakt mit dem Empfängergewebe zu erkennen (Hench und Wilson, 1984). Manche Werkstoffe bilden zwar (nicht-toxische) Korrosionsprodukte, sind aber relativ verträglich. Sie bezeichnet man als "biotolerant" (Osborn, 1979). Als eine Sonderform sind modifizierte Materialien aufzufassen, welche zusätzlich zu ihrer hervorragenden

Biokompatibilität über die Eigenschaft verfügen, eine gewünschte Gewebeneubildung zu induzieren. Diese Stoffe, welche z.B. Knochenneubildung osteoinduktiv initiieren, bezeichnet man als "bioaktiv" (Osborn, 1985; Ohgushi et al., 1990).

Biokompatibilität wird durch In-vivo- oder In-vitro-Experimente überprüft, wobei die Untersuchungen sich ergänzen müssen (Williams, 1982).

In Hinblick auf mögliche Korrosionsprodukte und eine Kratz- und Verschleißbeständigkeit kommt die tribologische Eigenschaft einer Prothese zum Tragen. Unter Tribologie versteht man die Lehre von Reibungs-, Schmierungs- und Verschleißvorgängen, eine Wissenschaft, deren Anfänge schon auf Leonardo DaVinci zurückreichen (Streicher, 1993).

### **1.3 Versuche zur Biomaterialientestung**

#### **1.3.1 Tierversuche**

Vorangiges Ziel der Testung eines Biomaterial, vergleichbar der eines Arzneimittels, muß es sein, schädigende Wirkungen vor der Applikation am Menschen zu ermitteln und auszuschalten.

In den dreißiger Jahren wurden erste Tierversuche zur Materialientestung etabliert, wie z.B. bei Hasen intradermal implantierte Legierungen im dentalen Bereich (Dixon und Rickert, 1933). Bis heute sind Tierversuche nach wie vor ein unverzichtbares Hilfsmittel in der Biomaterialienforschung (Grote et al., 1986; Hayashi et al., Orth et al., 1990, 1991; Wilke et al. 1991, 1993). Seit jeher bestanden jedoch Bedenken hinsichtlich der Standardisierbarkeit der Experimente und der Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen, begleitet von Nachteilen durch hohe Kosten und zeitaufwendige Versuche. Ferner rückten die zunehmenden ethischen Bedenken gegenüber der Nutzung von Tierversuchen die in-vitro-Testung als Alternative zum In-vivo-Versuch stärker in den Mittelpunkt des Interesses.

#### **1.3.2 Zellkultur**

Die ersten Biokompatibilitätstestungen führte Kawahara (Kawahara et al., 1955) Mitte der fünfziger Jahre in Form einer "Hangig drop culture" an Herzmuskelexplantaten von Hühnerembryonen durch, um Migrations- und Ausdehnungsverhalten des Gewebes nach Kontakt mit dentalen Werkstoffen zu beurteilen. Die Gewebekulturen sollten

durch möglichst dichten Kontakt mit den Materialproben Aufschluß über deren Toxizität geben. Der Nachteil dieser Methode, die fehlende Unterscheidungsmöglichkeit zwischen Zellmigration und Zellproliferation, veranlaßte Kawahara, die erste reine Zellkultur in "Direktkontaktmethode" einzuführen (Kawahara et al., 1968). Dabei handelte es sich um eine Flüssigmediumzellkultur mit einschichtigem Zellrasen (Monolayer) aus Mausfibroblasten. Durch den direkten Kontakt der Testmaterialien mit den Zellen der Kultur war es zum ersten Mal gelungen, materialbedingte Auswirkungen auf Zellzahl und -morphologie zu erfassen und zu quantifizieren. Verbesserungen stellten die "Agar Overlay Methode" von Guess (Guess et al., 1965), deren Weiterentwicklung in Form der "Millipore-Methode" durch Wennberg (Wennberg et al., 1979) und die Extraktionsmethode nach Homsey (Homsey et al., 1979) dar, die alle auch noch heute als die gebräuchlichsten Testmethoden zur Biokompatibilitätsprüfung gelten. Die Vorteile der Zellkultur zeigten sich in ihrer relativen Kostengünstigkeit, in den kurzfristig vorliegenden Ergebnissen und der entsprechend der vorhandenen Fragestellung einfachen Quantifizierbarkeit der Ergebnisse (Brauner und Kaden, 1989).

Die "Agar Overlay Methode" ermöglicht aufgrund ihrer Versuchsanordnung, bei der der Zellrasen durch eine dünne Agarschicht bedeckt wird, auch eine Testung von Materialien geringer Dichte. Der Ersatz der Agarschicht durch einen Millipore-Filter bei der Methode nach Wennberg half, die Diffusionsstrecke zwischen Material und Zellen zu verringern. Die Extraktionsmethode erlaubte es, mit Hilfe unterschiedlicher Extrakt-konzentrationen eine Toxizitätsschwelle der Materialien zu ermitteln.

Trotz ihrer Vorteile, die diese Zellkulturen den Tierversuchen gegenüber boten, wie z.B. eine sensitivere Reaktion der Zellen gegenüber toxischen Materialbestandteilen unabhängig von Abwehrreaktionen tierischer Organismen und endokriner Regelkreise, zeigten sich in der Analyse verschiedener Materialien erhebliche Diskrepanzen, welche sowohl in der Auswahl der kultivierten Zellarten (Johnson et al., 1983) als auch in der unterschiedlichen Methodik begründet lagen. Es fanden neoplastische Zelllinien unterschiedlichster Tierspezies (Taylor et al., 1973; Pappas et al., 1968; Mital et al., 1968), humane Zellen neoplastischen Ursprungs (Rappaport et al., 1964), humane Fibroblasten (Wilsnack et al., 1973) und diverse andere Zellarten humanen und tierischen Ursprungs Anwendung. In zahlreichen Studien konnte ein Beeinflussung auf die Testsensitivität durch die Anwendung verschiedener Zellarten bei sonst gleichen Kulturbedingungen gezeigt werden. (Nuwayser et al., 1973; Browne et al., 1979; Lang

et al., 1989; Naji et al., 1990; Caughman et al., 1990; Harmand et al., 1990; Puleo et al., 1991; Jansen et al., 1991; Berstein et al., 1992; Niederauer et al., 1994). Auch die unterschiedlichen Zellkulturmethoden führten zu abweichenden Testresultaten bei identischen Materialien (Wilsnack et al., 1973; Hensten-Pettersen et al., 1977; Johnson et al., 1983; Welker et al., 1983; Haustveit et al., 1984). Diese Erfahrungen mit Zellkulturen führten zu der Forderung, ein Testsystem zu etablieren, welches der physiologischen Implantationssituation beim menschlichen Patienten möglichst nahe kommt, mit anderen Worten Zellkulturen zu benutzen, die auch tatsächlich im klinischen Alltag Kontakt zu entsprechenden Biomaterialien haben (Pizzoferrato et al., 1985; Kamen et al., 1989; Harmand et al., 1990).

Im Laufe der Jahre zeigte sich, daß neben primären Zellkulturen auch Zelllinien für die Qualität der Vorhersagekraft der Testkultur von großer Bedeutung sind. In den Anfängen wurde auf meist wenig differenzierte, embryonale oder neoplastische Zelllinien zurückgegriffen (Taylor et al., 1973; Pappas und Cohen, 1968; Mital und Cohen, 1968). Auch die ersten humanen Zellen waren neoplastischen Ursprungs (Rappaport, 1964). Als Ergebnis zeigte sich auch bei identischen Kulturbedingungen eine große Variationsbreite bezüglich der Sensitivität gegenüber den getesteten Biomaterialien (Johnson et al., 1983), so daß es wenig sinnvoll erschien, Zellen zu benutzen, die in situ keinen Kontakt zum implantierten Material haben (Browne und Tyas, 1979). In der Testung von orthopädisch relevanten Biomaterialien, welche in situ im Kontakt mit Knochenmarkzellen stehen, ist z.B. die Anwendung von kultivierten humanen Knochenmarkzellen in den Versuchsreihen sinnvoller, als z. B. auf Fibroblasten oder gar Tumorzellen zurückzugreifen, wie Ergebnisse von Versuchen mit humanen Knochenmarkszellen in Korrelation zum Tierexperiment (Wilke et al., 1992, 1993) gezeigt haben.

Die Arbeitsgruppe "Experimentelle Orthopädie" der Universitätsklinik Marburg bedient sich, aufbauend auf die Langzeitknochenmarkszellkultur von Dexter, Gartner, Kaplan und Kalla (Dexter et al., 1977; Gartner und Kaplan, 1991; Kalla et al., 1991), einer Knochenmarkszellkultur humanen Ursprungs. Das für die kultivierten Zellen verwendete Medium enthält die für die physiologische Entwicklung der Zellkultur erforderlichen Substanzen und wurde durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren ergänzt (Kalla et al., 1991). Auch die dort beschriebene Methode der Knochenmarksgewinnung fand Anwendung. Jedoch erwies sich die ursprüngliche Vorgehensweise der

Sternalpunktion als ineffizient, da zum einen nur geringe Mengen Knochenmark zu erhalten waren, zum anderen eine hohe Kontamination durch Erythrozyten vorlag. Aus diesem Grund ging man von einem Spongiosablock definierter Größe (7x10x20 mm) aus, der bei der Implantation einer Hüft-Totalendoprothese entnommen wurde. Für den Patienten stellt dieses Vorgehen keine zusätzliche Belastung dar, da bei der Anlage der Markhöhle für den Prothesenschaft in jedem Fall Spongiosa ausgeräumt wird, welche sonst verworfen werden würde.

### **1.3.3 Die humane Knochenmarkszellkultur**

Die humane Knochenmarkszellkultur verfügt über differenzierte und undifferenzierte Zellen. Aufgrund dieser noch nicht determinierten Progenitorzellen, welche sich in verschiedene Richtungen entwickeln können (Stutzmann et al., 1982), besitzt diese Art von Kultur den entscheidenden Vorteil, daß man mit ihrer Hilfe Aussagen über zu erwartende lokale Gewebsreaktionen bei entsprechendem Materialkontakt machen kann (Wilke et. al., 1994). Hinzu kommt, daß sich in der humanen Knochenmarkszellkultur immunkompetente Stammzellen sowie osteoblastäre Zellen befinden. Die klinische Erfahrung zeigt, daß Patienten, die mit einer Totalendoprothese versorgt worden sind, insgesamt eine Veränderung ihrer immunkompetenten Zellen mit der Möglichkeit der Allergisierung aufweisen. Die humane Knochenmarkszellkultur bietet hier ein Modell, solche Phänomene näher zu beleuchten und einen Erklärungsansatz zu finden. Neben der eigentlichen "Verträglichkeit" des Biomaterials mit dem Gewebe des Empfängers kommt der knöchernen Verankerung des Implantats in Form eines "bone ingrowth" in die Oberflächenschicht der Prothese eine koexistente Bedeutung zu. Somit darf die Analyse osteoblastärer Zellen, welche wir in der humanen Knochenmarkszellkultur vorfinden, nicht fehlen.

### **1.3.4 Wachstumsfaktoren**

Die in der Knochenmarkszellkultur befindlichen Zellen der Leukopoese (Granulopoese, Monozytopoese, Thrombozythopoese und zum Teil der Lymphopoese) wurden in Anlehnung an Kalla (Kalla et al., 1991) durch die Wachstumsfaktoren GM-CSF und IL-3 in ihrem Wachstum und ihrer Differenzierung stimuliert. Die Bedeutung der Wachstumsfaktoren für Proliferation und Differenzierung hämopoetischer Zellen wurde bereits 1966 von Bradley und Metcalf beschrieben. Viele hämopoetische

Wachstumsfaktoren sind jedoch unter physiologischen Konditionen im Serum nahezu nicht nachweisbar (Freund, 1989), und erst in den achtziger Jahren gelang eine industrielle Produktion von GM-CSF (Wong et al., 1985; Cantrell et al., 1985) und damit verbunden ein breiter therapeutischer Einsatz von Wachstumsfaktoren. In der vorliegenden Arbeit wurden GM-CSF sowie IL-3 der Fa. Behringwerke AG. zur Zellkultivierung benutzt, wobei GM-CSF in Anlehnung an Cantrell (Cantrell et al., 1985) von HUT 102 Zellen geklont und das Genprodukt in *Escherichia coli* exprimiert worden war. Interleukin 3 wurde von aus dem peripheren Blut stammenden Lymphozyten geklont und das Genprodukt in Weizen exprimiert (Gillis et al., 1988). Bei Betrachtung der stimulierten Zellreihen durch beide Wachstumsfaktoren fällt ein fast identisches Zellprofil auf (vgl. nachstehende Tabelle), wobei ein kombinierter Einsatz beider Faktoren für eine gesteigerte Zellproliferation entscheidend ist, da auf diese Weise ein Zusammenspiel humoraler Induktionsmechanismen gewährleistet ist, wie klinische Studien an Patienten mit gesundem und durch Chemotherapie supprimiertem Knochenmark gezeigt haben (Oster et al., 1991; Herrmann et al., 1989).

GM-CSF	IL-3
Granulopoese	Granulopoese
Monopoese	Monopoese
Eosinophile	Eosinophile
Basophile	Basophile
Megakaryopoese	Megakaryopoese
Erythropoese	Mastzellen

(Freund 1989)

#### 1.4 Anforderungen an orthopädisch genutzte Implantate

Zusätzlich zu den Bedingungen der Biokompatibilität müssen an Implantatmaterialien mit Blick auf die langfristig ausgelegte Funktionsfähigkeit (Willert et al., 1979, 1981) weitere Anforderungen an biologische und technische Eigenschaften gestellt werden. So müssen Dichte, Stabilität und Elastizität des Knochens berücksichtigt werden. Der Knochen lebt. Er unterliegt dem Stoffwechsel des menschlichen Organismus und ist darüber hinaus durch diverse funktionelle und biomechanische Eigenschaften

gekennzeichnet (Serre et al., 1990). Jedes Biomaterial kann Einfluß auf die Wundheilung nehmen, spezielle Reparationsmechanismen induzieren und Fremdkörperreaktionen hervorrufen. Beleites (Beleites et al., 1993) stellt die für die Integration in den Organismus notwendigen Bedingungen wie folgt dar:

Werkstoffeigenschaften:

- mechanische Stabilität
- thermisches Verhalten wie Knochen
- chemische Stabilität gegenüber Körpermedien
- biologische Stabilität gegenüber dem Angriff von Mikroorganismen

Physiologisch verträgliches Verhalten:

- Biokompatibilität (biotolerant,-inert,-aktiv)
- keine toxischen Wirkungen

Herstellung:

- ökonomisch vertretbarer Aufwand
- Anwendung üblicher Techniken
- oberflächenmodifizierbar

Anwendung:

- einfache Handhabung
- mittels einfacher Methoden sterilisierbar

## **1.5 Grundlagen für das Einwachsen von Knochengewebe in die Implantatoberfläche (bone ingrowth)**

Das Einwachsverhalten des Implantatmaterials in den Knochen verläuft phasenweise und ist mit einer Knochendefektheilung vergleichbar.

Die erste Phase ist durch eine Entzündungsreaktion gekennzeichnet. In der zweiten Phase, der reparativen Phase, welche im Tierversuch bis zu zwei Wochen andauert (Griss et al., 1975, Griss et al., 1976; Galante et al., 1971), kommt es zur Einwanderung mesenchymaler Stammzellen mit Differenzierung zu Osteoblasten. Am Ende der reparativen Phase steht der primitive Geflechtknochen, welcher in ca. vier Wochen in der Umbauphase zum reifen Lamellenknochen formiert wird (Griss et al., 1975, Griss et al., 1976; Galante et al., 1971).

### **1.5.1 Extrazelluläre Matrix**

Die Verkalkung des Knochens ist ein mehrschichtig ablaufender und in vielen Details noch ungeklärter Prozeß, in dem in erster Linie Osteoblasten und Kollagenfasern eine tragende Rolle einnehmen. Die Interzellulärsubstanz oder auch extrazelluläre Matrix des Knochens wird als Knochengrundsubstanz bezeichnet.

Extrazelluläre Matrix besteht vorrangig aus amorpher Grundsubstanz und Fasern (Kollagen, retikuläre, elastische Fasern), deren vorherrschender Typ die spezifischen Eigenschaften des betreffenden Gewebes kennzeichnet (Junqueira und Carneiro, 1996). Knochengrundsubstanz besteht zu ca. 50% aus Mineralien, zu 25% aus organischen Verbindungen und zu weiteren 25% aus Hydrationswasser. Unter dem organischen Material überwiegt das in Fasern vorliegende Kollagen (90-95%). Synthese und Reifung des Kollagens findet intrazellulär im Osteoblasten statt. Daneben entstehen aus den Osteoblasten weitere, nicht-kollagene Proteine der Knochenmatrix, wie das am häufigsten vorkommende Osteokalzin. Hierbei handelt es sich um ein knochen-spezifisches Protein, welches eng mit dem Beginn des Mineralisierungsprozesses (Boskey, 1989) und der Knochenformation (Weinstein und Gundberg, 1983) in Verbindung zu stehen scheint und dessen Serumspiegel eine große Korrelation zur Knochendichte aufweist und den reifen Osteoblasten charakterisiert (Sherman et al., 1992). Osteokalzin gilt als ein spezifischer, sensibler und äußerst rasch ansprechender Marker osteoblastischer Aktivität (Nielsen et al., 1991). Weitere, von Osteoblasten synthetisierte nicht-kollagene Matrixproteine sind Osteopontin und Osteonectin sowie phosphorylierte Glycoproteine, welche alle eine starke Affinität zu Hydroxylapatiten, Kollagenfibrillen oder zu zellulären Strukturen besitzen und alle an der Regulation der Mineralisierung beteiligt sind (Hultenby, 1994; Heinegard und Oldberg, 1993; Young et al., 1993). Die Mineralisation von organischer Matrix stellt den Abschluß der Einbauvorgänge von Implantatmaterialien in das knöcherne Lager dar.

In Anlehnung an diese physiologischen Vorgänge stellen die Analysen metabolischer Differenzierung von Zellen, wie z.B. die Aktivitätsbestimmung von Alkalischer Phosphatase oder der Nachweis sezernierter Matrixproteine wie Osteokalzin mögliche Methoden der Biokompatibilitätsprüfung dar. Desweiteren finden zahlreiche andere Techniken wie z.B. die Quantifizierung von Zellproliferation mittels Einbau



radioaktiver Thymidinisotope (Fasol et al., 1985; Pizzoferrato und Ciapetti, 1983), die Bestimmung der Zellvitalität mittels Messung der Laktatdehydrogenase (Rae, 1975) oder die Färbung vitaler Zellen unter Anwendung des "methylthiazolyldiphenyl tetrazolium colorimetric assay" (Mosmann, 1983) sowie Vitalfärbungen mit "neutral red" (Powell et al., 1970), bei Untersuchungen zur Biokompatibilität von Werkstoffen Anwendung.

## **1.6 Ziel der vorliegenden Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mit Hilfe einer humanen Knochenmarkszellkultur eine Biokompatibilitätsbewertung von orthopädisch relevanten Implantatmaterialien vorzunehmen (Davies, 1996) .

Die humane Knochenmarkszellkultur bietet nämlich die Möglichkeit, den zuvor beschriebenen mehrphasigen Prozeß des "bone ingrowth" der klinischen Situation angenähert in Abhängigkeit des entsprechend zu testenden Biomaterials in vitro zu simulieren, da die Zellkultur über alle am Prozeß beteiligten Zelltypen verfügt.

Dies beinhaltet im konkreten Fall zunächst die Präparation und Kultivierung von im Rahmen einer Hüftoperation gewonnenen humanen Knochenmarkszellen auf industriell vorgefertigten, definierten Biomaterialprobenkörpern und deren Vitalitäts- und Wachstumskontrolle mit Hilfe entsprechender Färbungen.

Im weiteren Verlauf dient die rasterelektronenmikroskopische Verarbeitung der detaillierteren Betrachtung der Zellmorphologie und der Erfassung erster Hinweise auf extrazelluläre Matrixbildung.

Die prinzipielle und möglicherweise in ihrer quantitativen Ausprägung biomaterialabhängig differenzierende und damit als Indikator für den Grad der Biokompatibilität dienende (Olmo et al., 1988) Produktion von eben genannter extrazellulärer Matrix (EZM) im In-vitro-Experiment stellt dabei einen wesentlichen Aspekt dar, dem in der vorliegenden Arbeit nachgegangen werden soll.

Hierzu bedienen wir uns dem Nachweis der obengenannten Komponenten der EZM, wobei wir den Schwerpunkt auf die Kollagene I und III, sowie auf das nicht-kollagene Protein Osteokalzin legen. Zusätzlich zu diesen Matrixbestandteilen betrachteten wir die Konzentration an Alkalischer Phosphatase. Veränderungen der Aktivität dieser knochentypischen Isoform des Enzyms bei Kontakt mit einem Biomaterial werden als

Marker im Bereich des Knochenmetabolismus bei In-vitro-Testungen diskutiert (Bianco et al., 1989; Jones et al., 1988; Kubo, 1993). Ferner dient es als Syntheseprodukt von Osteoblasten, zur Kontrolle ihrer Aktivität. Nicht zuletzt rechtfertigt die Lokalisation von Alkalischer Phosphatase an chondrozytären Plasmamembranen und an frühesten mineralischen Ablagerungen ihre Funktion als Marker potentieller Knochenneubildung (de Bernard et al., 1986).

Um Aufschluß über etwaige, materialabhängige Änderungen im Differenzierungsverhalten der Zellen (T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Granulozyten) sowie neben qualitativen auch quantitative Resultate zu gewinnen, finden histochemische und immunfluoreszendierende Färbungen mit monoklonalen Antikörpern, Blot-Analysen sowie die Durchflußzytometrie mit Hilfe eines FACS-(fluorescence activating cell sorter) Gerätes Eingang in die Untersuchung.

Schließlich soll die Etablierung einer Langzeitkultur über weitere morphologische Veränderungen und über evtl. Mineralisierungsvorgänge in Abhängigkeit vom Material Aufschluß geben.

Darüber hinaus wird das vorhandene Repertoire an bereits in Tierexperimenten, klinischen Anwendungen oder zellkulturellen Versuchen getesteten Biomaterialien der Arbeitsgruppe Experimentelle Orthopädie um solche erweitert werden, die bisher noch nicht ausreichend Gegenstand entsprechender Untersuchungen waren.

Die Auswahl der verwendeten Biomaterialien orientierte sich dabei an den von Osborn (1979) aufgestellten Kriterien zur Klassifizierung von Implantatmaterialien. Dabei wurden gemäß dieser Kriterien Werkstoffe ausgewählt, die klinisch relevant waren und nach bisherigen klinischen und experimentellen Erfahrungen jeweils einer Klassifizierungskategorie zuzuordnen sind.

Als ein bioaktiver Werkstoff kommt eine Hydroxylapatitkeramik zur Anwendung. Bioaktive Implantatstoffe gelten körpereigenen Materialien als chemisch ähnlich oder identisch. Man hat es mit einer physiologischen Integration in den Knochen (Verbundosteogenese) verglichen. Ultrastrukturell ist eine bis zu 1 µm dicke, kalzium- und phosphathaltige, proteinreiche Verbundzone nachweisbar (de Bruijn et al., 1992). Desweiteren werden Probenkörper aus Reintitan Gegenstand der Untersuchung. Hierbei handelt es sich um bioinerte Werkstoffe, die als sehr gut biokompatibel gelten. Sie wurden als absolut lösungsstabil (korrosionsbeständig) beschrieben. Durch Einwachsen

knöcherner Strukturen in die zumeist aufgerauhte Titanoberfläche kommt es zu einem formschlüssigen, allerdings rein mechanischem Verbund (Semlitsch, 1984). Verglichen damit wird eine neue Titanlegierung benutzt, deren Oberfläche mittels diffundierten Sauerstoffs verändert wurde.

Aus der Substanzklasse der Kunststoffe benutzten wir Ultra-High Molecular-Weight Polyethylene (UHMWPE), das als mäßig biotolerantes Material anzusehen ist (Griss et al., 1993; Willert et al., 1978; Willert et al., 1990). Biotolerante Werkstoffe wurden als genügend resistent gegen das sie umgebende Gastgewebe erachtet. Entstehende Abbauprodukte wurden als unkritisch angesehen. Bei knöchernem Einbau wurden sie allerdings bindegewebig eingeschleitet.

### ***Keramiken:***

#### **Cerasiv® (Hydroxylapatitkeramik)**

Hydroxylapatitkeramiken gelten aufgrund der großen Ähnlichkeit zwischen technisch erzeugten und biologischen Hydroxylapatit und ihrem bis zu 70%igem Vorkommen in der mineralischen Komponente des Knochens (Osborn, 1985, 1987; Rahn, 1994) als Materialien mit sehr guter Biokompatibilität, was trotz zum Teil differierender Testverfahren von zahlreichen Autoren übereinstimmend festgestellt wurde (Bagambisa und Joos, 1990; de Bruijn et al. 1992; Harmand et al., 1986; Lange und Donath, 1989; Malik et al., 1992; Rout et al., 1987; Teti et al., 1991; Uchida et al., 1987; Winter et al., 1981).

### ***Metalle:***

#### **Reintitan**

Hierbei handelt es sich um ein weit verbreitetes Implantatmaterial mit hoher Festigkeit und sehr guter Korrosionsbeständigkeit und einer durch unterschiedliche Testverfahren (Davies et al., 1990; Golgring et al., 1990; Howlett et al., 1994; Kawahara und Nakamura, 1968; Koekoenen et al., 1992; Kotoura et al., 1985; Lowenberg et al., 1991; Maurer et al., 1994; Puleo et al., 1993; Semlitsch, 1984) übereinstimmend ermittelten guten Biokompatibilität.

### ***Titanlegierung***

#### **Ti6Al7Nb-ODH (Oxygen Diffusion Hardening )**

Bei dieser Titanlegierung, die seit 1984 als Implantatmaterial Verwendung findet, handelt es sich um eine Weiterentwicklung der bis dahin gebräuchlichen Vanadium-Titanlegierung, welche aufgrund toxischer Wirkungen von im Körper freigesetztem Vanadium Anlaß zur Diskussion gab (Laing, 1979). Es ist ein sehr körperverträgliches und obendrein korrosionsbeständigeres Material als Reintitan (Semlitsch et al., 1991, 1995). Durch seine ODH-Oberflächenhärtung, bei der Sauerstoff bis zu einer Tiefe von 30 µm (Heisig, 1994 ) in die Titanoberfläche diffundiert, wird eine besonders starke Kratz- und Verschleißbeständigkeit der Prothese erreicht und damit ein Vorteil in Hinblick auf ihre tribologische Eigenschaft verzeichnet (Streicher et al., 1991).

### ***Kunststoffe:***

#### **Polyäthylen**

Erstes, erfolgreich zu implantierendes Polyäthylen entstand zu Beginn der sechziger Jahre in Form von "ultra high molecular weight polyethylene", nachdem bereits in den späten dreißiger und fünfziger Jahren Polyäthylenprodukte auf Grund hoher Materialbrüchigkeit ihrer Anwendung im klinischen Bereich nicht standgehalten haben. Durch die erste erfolgreiche Anwendung von Charnley (Charnley, 1960) fand es seine Verbreitung als Pfannenmaterial für Arthroplastiken. Es ist als ein biotolerantes Biomaterial aufzufassen (Harms und Mäusle, 1980), wobei jedoch in jüngster Zeit unter dem Begriff der "polyethylen-disease" starke Fremdkörperreaktionen durch mechanische Abriebpartikel diskutiert werden (Griss et al., 1993; Jasty et al., 1994; Kaplan et al., 1992; Lintner et al., 1988; Streicher, 1994; Willert et al., 1978, 1990).

## 2. Material und Methoden

### **Verwendete Labormaterialien**

Aceton (*E. Merck, Darmstadt, Germany*)

Acridin-Orange (*Aldrich-Chemie*)

Alcianblau (*Chroma*)

Anti mouse IgG biotin conjugate antibody (*Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany*)

Anti rabbit IgG-biotin F<sub>(ab'2)</sub> fragment (*Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany*)

Auflichtmikroskop Leitz Aristomet und Orthomate (*Ernst Leitz, Wetzlar, Germany*)

Becherglas Schott-Duran (*Germany*)

Begasungsbrutschrank B-5060 (*Heraeus, Frankfurt, Germany*)

Bovines Serumalbumin (BSA) (*Serva-Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg, Germany*)

Brillant Crocein Säurefuchsin (*Chroma*)

5-Bromo-4 Chloro-Indolylphosphat (*Sigma-Chemical, St. Louis, USA*)

Cacodylat Puffer (*Serva-Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg, Germany*)

CD2-monoklonaler T-Lymphozyten Antikörper, BMA 0111 (*Behring, Marburg, Germany*)

CD14-monoklonaler Monozyten Antikörper, BMA 0211 (*Behring, Marburg, Germany*)

CD15-monoklonaler Granulozyten Antikörper, BMA 0200 (*Behring, Marburg, Germany*)

CD19-monoklonaler B-Lymphozyten Antikörper, BMA 0130 (*Behring, Marburg, Germany*)

Cellulosenitrat Nukleinsäure und Protein Transfermedium BA 85; 0,45 µm (*Schleicher & Schuell, Dassel, Germany*)

Certomycin (*Essex Pharma, München, Germany*)

4-Chloro-1-naphtol (*Serva-Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg, Germany*)

Critical-Point-Kammer (*Balzers Union, Balzers, FL*)

Durchlichtmikroskop Olympus MTV-3 (*Olympus, Japan*)

**E**isenhämatoxylin nach Weigert (*Chroma*)

Essigsäure (*Riedel de Haen*)

Ethanol (*E. Merck, Darmstadt, Germany*)

Excel 5.0 (*Microsoft Corporation, USA*)

Extravidin AP konjugiert (*Sigma-Chemical, St. Louis, USA*)

Extravidin FITC konjugiert (*Sigma-Chemical, St. Louis, USA*)

**F**ACSTar Plus Cell-Sorter (*Becton Dickinson, USA*)

FACSTar Plus Software (*Becton Dickinson, USA*)

Fetales Kälberserum (FKS) (*Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany*)

Ficoll Separating Solution; Density 1.077 (*Biochrom KG, Berlin, Germany*)

Film Ilford-FP4 Plus-125 (*Ilford, Cheshire, UK*)

Filteraufsatz Nunc (*Nunc, Roskilde, Denmark*)

**G**elatine 1% (*Sigma-Chemical, St. Louis, USA*)

Gibco Iscove's Mod. Dulbecco's Medium (*Life Technologies, Paisley, Scotland, UK*)

Glaspipetten; 230 mm (*Mainz, Germany*)

Glaszylinder (*Scherf, Germany*)

Glutaraldehyd (*Serva, Heidelberg, Germany*)

Glutaraldehyd 25% (*E. Merck, Darmstadt, Germany*)

GM CSF (*Behring Werke, Marburg, Germany*)

**H**<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (*E. Merck, Darmstadt, Germany*)

HCl (*E. Merck, Darmstadt, Germany*)

Histopaque Separating Solution; Density 1.119 (*Sigma Diagnostics, St. Louis, USA*)

Hydrocortison (*ICN Biomedical GmbH, Meckenheim, Germany*)

**I**nterleukin III (*Behring Werke, Marburg, Germany*)

**K**amera Pentax K1000 (*Asahi Pentax, Japan*)

Kulturflasche (*Greiner, Frickenhausen, Germany*)

**L**-Glutamin 200 mmol. (*ICN Biomedical GmbH, Meckenheim, Germany*)

6-Lochplatten (*Greiner, Frickenhausen, Germany*)

**M**ab to osteocalcin human antibody (*Biodesign*)

Magermilchpulver (*E. Merck, Darmstadt, Germany*)

Magnesiumchlorid Hexahydrat (*E. Merck, Darmstadt, Germany*)

Magnetrührer Heidolph MR 2002 (*Heidolph, Germany*)

Mouse monoclonal anti-bovine osteocalcin, (*Pierce, Rockford, USA*)

**NaCl** (*E. Merck, Darmstadt, Germany*)

$\text{NaHCO}_3$  5% (*E. Merck, Darmstadt, Germany*)

Naphtol-As-Bi-Phosphat (*Sigma-Chemical, St. Louis, USA*)

Neu-Fuchsin (*Sigma-Chemical, St. Louis, USA*)

Neubauer-Zählkammer (*Schreck, Hofheim, Germany*)

Nitro-Blue Tetrazolium (*Sigma-Chemical, St. Louis, USA*)

N,N-Dimethylformamid (*E. Merck, Darmstadt, Germany*)

**Optimas 2.0** (*Optimas Corporation, München, Germany*)

Osmiumsäure (*Serva-Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg, Germany*)

Osmomat 030 Cryoscopic Osmometer (*Gonotec*)

**P**apierfilter (*Schleicher & Schuell, Dassel, Germany*)

Pasteur-Pipetten, Glas

Petrischalen (*Greiner, Frickenhausen, Germany*)

Pferdeserum (HS) (*Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany*)

Phosphate buffer saline (PBS) (*Seromed-Biochrom KG, Berlin, Germany*)

Phosphorwolframsäure (*E. Merck, Darmstadt, Germany*)

Pipetten; 5, 10, 20 ml (*Greiner, Frickenhausen, Germany*)

Pipettenspitzen (*Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Germany*)

Pipetus (*Hirschmann Laborgeräte, Germany*)

Probencups (*Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Germany*)

**R**abbit-anti human collagen type I (*Chemicon internat. inc., Temecula, USA*)

RBT-Collagen III (*Chemicon internat. inc., Temecula, USA*)

REM-ISI-SX-30 (*Leitz-ISI GmbH, Wetzlar, Germany*)

**S**affron du Gatinais (*Chroma*)

Schüttler KS-10 Swip (*Edmund Bühler, Germany*)

Sigma Trizma®-Base (*Sigma-Chemical, St. Louis, USA*)

Sputter-Coater S150 (*Edwards-Hochvakuum, Frankfurt, Germany*)

Steril laminar flow bench (*Gelaire-BSB-4, USA*)

Streptavidin POD konjugiert (*Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany*)

**V**ideokamera DXC-930 P (*Sony, Japan*)

**W**aage Mettler P 1200 (*Mettler, Germany*)

Wasseraufbereitungsanlage (*Millipore, Eschborn, Germany*)

**Z**entifugenröhrchen; 50 ml (*Greiner, Frickenhausen, Germany*)

Zentrifuge Sepatech Labofuge G1 (*Heraeus, Frankfurt, Germany*)

Zentrifuge (*Beckmann-J2-21M/E Centrifuge-Glenrothes, Scotland, UK*)

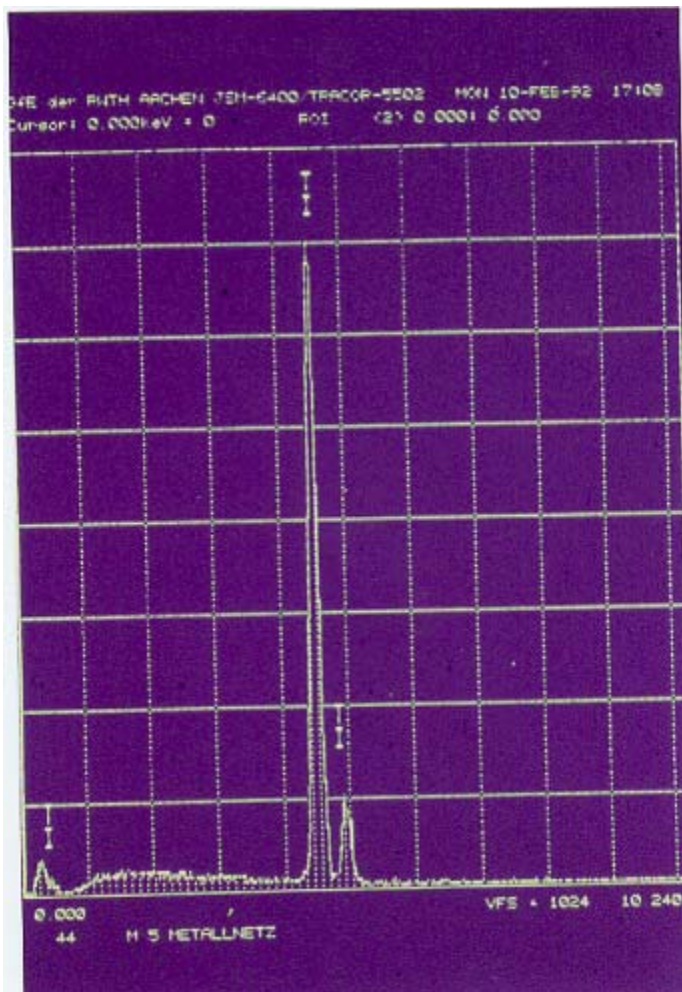
Zentrifugenröhrchen; 15 ml (*Falcon-Becton Dickinson, Plymouth, England*)

### **Verwendete Biomaterialien:**

Es fanden Keramiken, Metalle und Kunststoffe in Form von industriell gefertigten, scheibenförmigen Probenkörpern Eingang in die Untersuchungen.

Vor ihrer in-vitro-Anwendung wurden die nachstehenden Materialien in Zusammenarbeit mit der RWTH Aachen im Gemeinschaftslabor für Elektronenmikroskopie Dr. Burchard mittels energiedispersiver Röntgenanalyse (REM-EDX) auf Verunreinigungen untersucht.



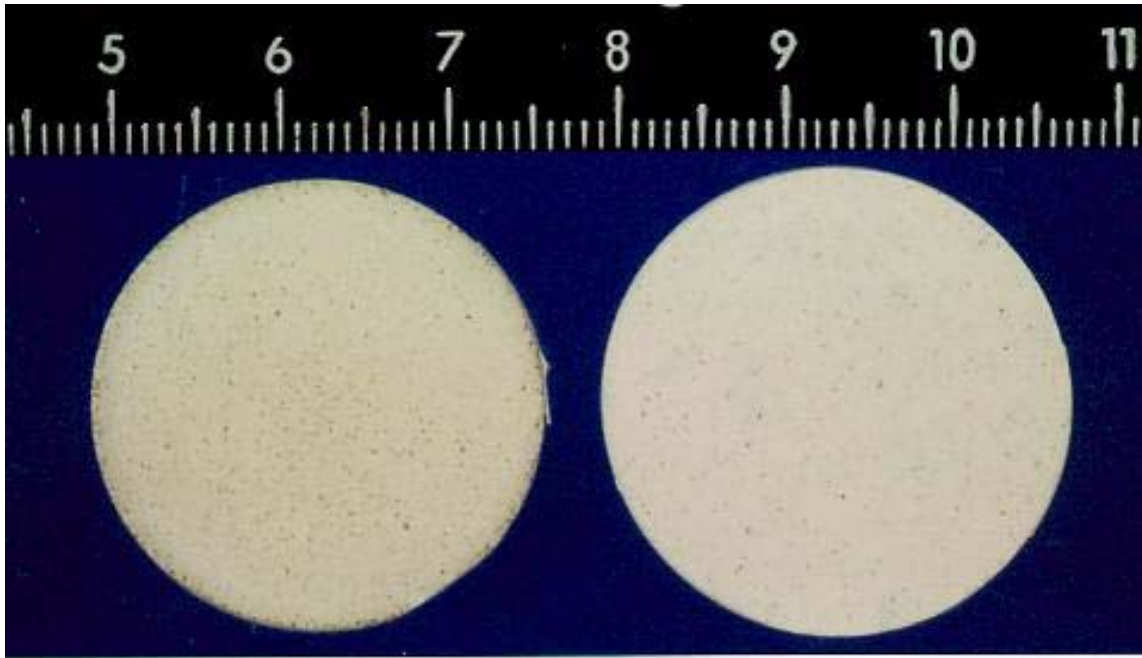


**Abb. 1:** REM-EDX einer Reintitan-Oberfläche.  
Kein Hinweis auf Verunreinigungen.

### Keramiken:

**Cerasiv<sup>®</sup>** (Fa. Cerasiv, Plochingen, Germany).

Hierbei handelt es sich um einen, bei 134 °C für 15 Minuten autoklavierten, 2 mm dicken Prüfkörper einer hochkristallinen, porösen Hydroxylapatit-Sinterkeramik mit einem Durchmesser von 26 mm.



**Abb. 2:** Hydroxylapatit-Keramik (Prüfkörper)

Metalle:

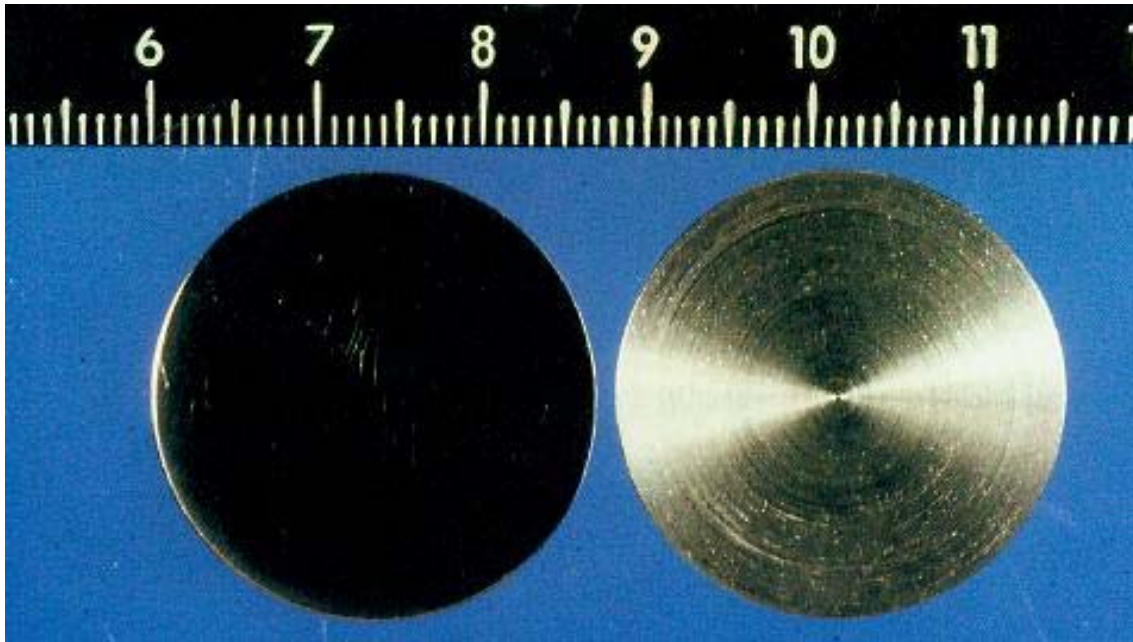
**Jeweils 3 mm in der Dicke und 27 mm im Durchmesser betragende Prüfmaterialien wurden benutzt.**

**1. Reintitan** (Fa. Zimmer ltd., Warsaw, USA)

**Chemische Zusammensetzung in Gewichtsprozent (Maximalangaben): N: 0,03; C: 0,1; H: 0,015; Fe: 0,2; O: 0,18; Ti: Rest**

**2. Ti6Al7Nb-ODH Tribosul®-100** (Fa. Sulzer Medizinaltechnik, Winterthur, Switzerland)

Eine sauerstoffgehärtete (Oxygen Diffusion Hardened) Titan-Aluminium-Niob-Legierung. Chemische Zusammensetzung in Gewichtsprozent: Al: 5,5-6,5; Nb: 6,5-7,5; Ta: 0,5 (max.); O: 0,2 (max.); C: 0,08 (max.); Ti: Rest



**Abb. 3:** Reintitan (Prüfkörper)



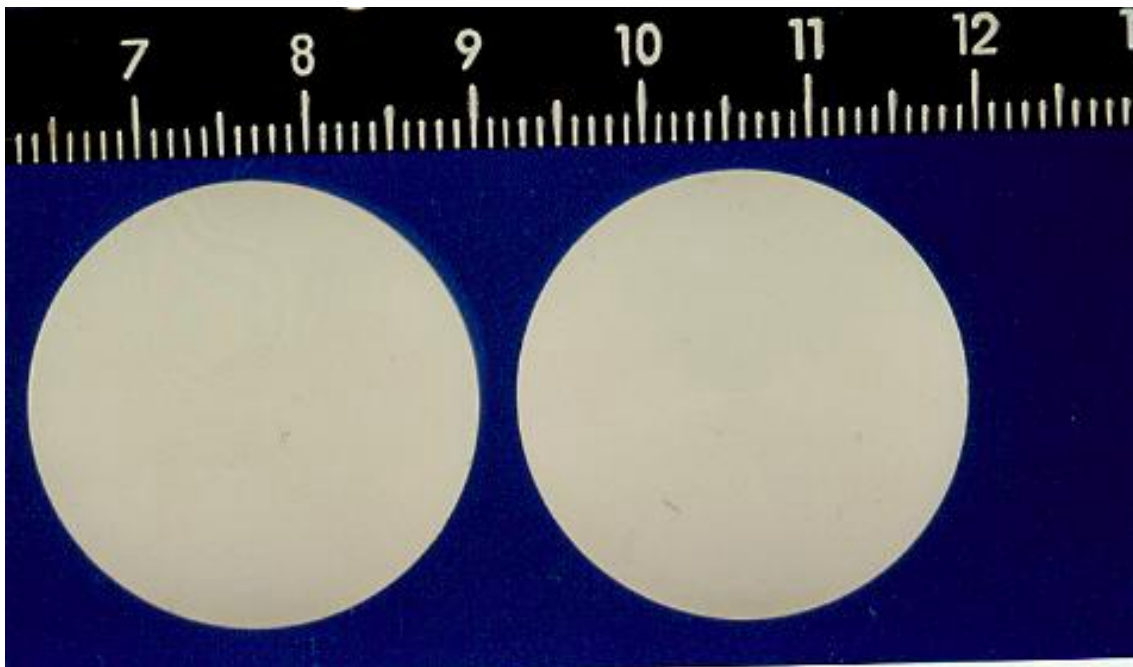
**Abb. 4:** Ti6Al7Nb-ODH Tribosul®-100 (Prüfkörper)

### Kunststoffe:

Aus der Gruppe der Polymere stammte diese hochmolekulare Polyäthylen-Probenscheibe mit gleichen Abmessungen wie die der Metallprüfkörper.

**UHMWPE-Ultra-High-Weight-Molecular-Polyethylene** (Fa. Zimmer Ltd., Warsaw, USA)

Handelsnahme: Himont-Hifax 1900 oder Hoechst-Hostalen Gur 412, 413, Grade Medical.

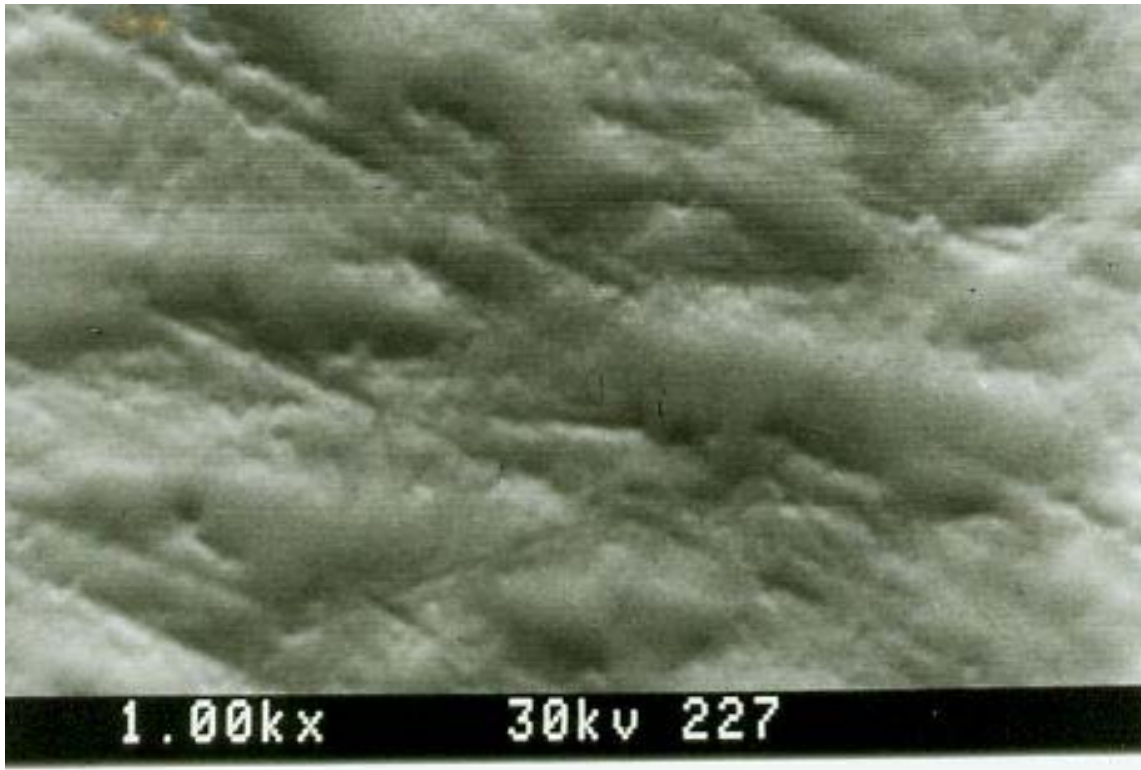


**Abb. 5:** Polyäthylen (Prüfkörper)

## **2.1 Rasterelektronenmikroskopie der Werkstoffe**

Vor der eigentlichen Analyse der Versuchsreihen wurden unbewachsene Biomaterialien elektronenmikroskopisch in Hinblick Ihrer Oberflächenstruktur untersucht. Die Oberflächen wurden von und nicht bearbeitet und fanden in der Zellkultur ihre Verwendung mit denselben Oberflächenstrukturen, die auch postoperativ in situ zu verwandt wurden.





**Abb.6:** Oberfläche eines unbewachsenen Reintitan Prüfkörpers in der Rasterelektronenmikroskopie. (Vergrößerung x 1000)

## **2.2 Energiedispersive Röntgenanalyse (REM-EDX)**

Die zu untersuchenden Werkstoffe wurden an der RWTH Aachen, im Gemeinschaftslabor für Elektronenmikroskopie (Herr Dr. Burchard) mit REM-EDX hinsichtlich ihrer vom Hersteller angegebenen Elementarzusammensetzung validiert (vgl. Abb. 1).

## **2.3 Das Nährmedium für die humane Knochenmarkszellkultur**

Für 500 ml Nährmedium wurden zunächst folgende Substanzen in einen Meßzylinder gefüllt und unter Rühren durchmischt:

Iscoves modifiziertes Dulbecco Medium: 8,85 g

L-Glutamin: 5 ml

Certomycin: 500 µl

NaHCO<sub>3</sub> 5%: 30 ml

Der Inhalt des Meßzylinders wurde auf 370 ml mit Milli Q Reinstwasser aufgefüllt und zur weiteren Verarbeitung unter die Sterilbench gegeben. Dort erfolgte eine Filtrierung in eine sterile Glasflasche und die Zugabe folgender Substanzen:

Fetales Kälberserum (FKS): 65 ml

Pferdeserum (HS): 65 ml

Hydrocortison: 500 µl

Die durchschnittliche Osmolarität des Mediums betrug 0,336 osm/l.

## **2.4 Die humane Knochenmarkszellkultur**

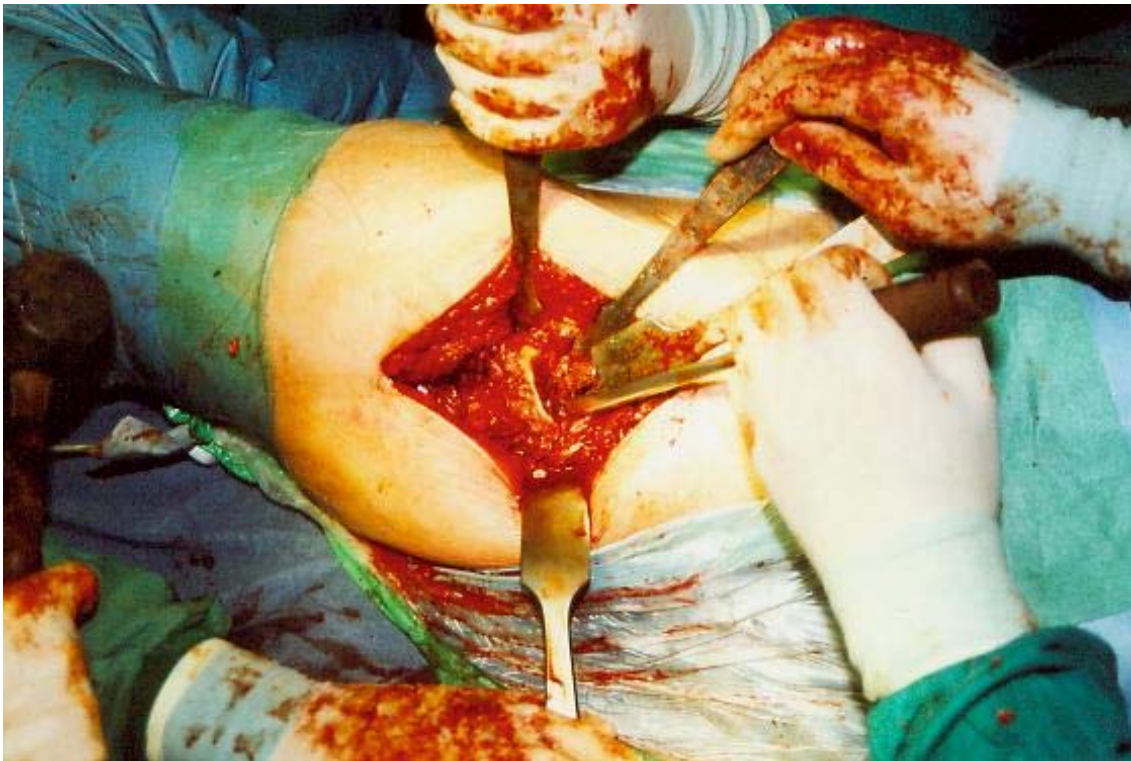
Zu Beginn wurde ein Gradientengemisch aus 54 ml Ficoll und 26 ml Histopaque erstellt und insgesamt wurden 20 Zentrifugenröhrchen zu 15 ml mit jeweils 4 ml diesen Gemisches befüllt.

Das der Zellkultur zugrunde liegende humane Knochenmark wurde nach vorherigem Ausschluß entzündlicher, rheumatischer oder sonstiger pathologischer Prozesse Patienten im Rahmen von Hüftgelenkersatzoperationen nach Durchführung der Femur-osteotomie entnommen. Hierzu erfolgte eine sterile Entnahme eines ca. 0,7 x 1 x 2 cm großen spongiösen, markhaltigen Knochenblocks aus der Trochanterregion. Die Aufarbeitung des Knochenmarks erfolgte unmittelbar nach der Entnahme unter einer laminar flow Sterilbench.

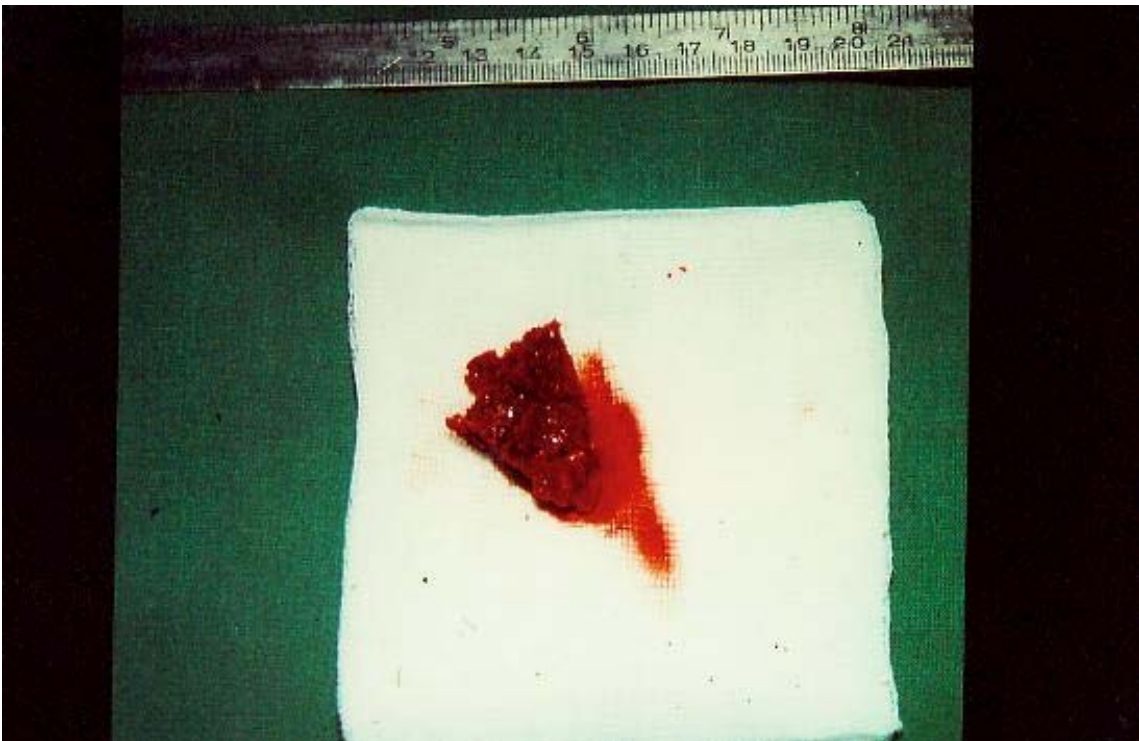
Der Knochenmarkblock wurde in eine Petrischale gegeben, mit 170 ml PBS überschichtet und mittels einer Knochenfaßzange zerkleinert. Nach mechanischer Zerkleinerung wurde das Knochenmark durch ein Zellsieb (Porengröße 100µm) gegeben, um spongiöse von markhaltigen zellulären Bestandteilen zu trennen.

Das vorbereitete Ficoll/Histopaque-Dichtegradientengemisch wurde vorsichtig mit je 8 ml der gesiebten Knochenmarkzell-/PBS-Suspension überschichtet und bei 10 °C und 2200 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Die dabei entstandene leukozytäre Interphase wurde aus jeweils fünf der 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt aufgenommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, dieses wurde bis zur 50 ml Markierung mit PBS aufgefüllt und 10 Minuten bei Raumtemperatur und 2000 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde bis auf einen Rest von 5 ml abgesaugt, erneut mit PBS aufgefüllt und ein zweites Mal für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 2000 rpm zentrifugiert. Gleiches Procedere wurde ein drittes Mal durchgeführt, diesmal wurde jedoch anstatt mit PBS mit Kulturmedium aufgefüllt.



**Abb. 7:** Operation einer Hüft-Totalendoprothese



**Abb. 8:** Knochenmark nach der Entnahme



**Abb. 9:** Dichtegradient nach der Zentrifugation.  
Man erkennt deutlich die leukozytenreiche Interphase. (Pfeil)

Am Ende des dritten Zentrifugationsschrittes wurde der Überstand bis auf einen Rest von 10 ml dekantiert und das entstandene Pellet wurde mit den restlichen 10 ml vermischt und in eine Kulturflasche überführt. Die Kulturflasche wurde bis auf 30 ml Inhalt mit Kulturmedium aufgefüllt, mit dem Datum der Präparation versehen und zur zweiwöchigen Inkubation bei 37°C, 12,5% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> in den Brutschrank gegeben.

Einen Tag nach der Präparation kamen noch jeweils 10 mg Interleukin III und GMCSF pro ml Medium in die Kulturflasche hinzu. Alle vier Tage erfolgte ein Medienwechsel



unter Austausch von 15 ml frischen Mediums und Zugabe von je 10 mg Interleukin III und GMCSF pro ml Medium.

#### **2.4.1 Aussaat von humanen Knochenmarkszellen auf die Testmaterialien**

Nach einer vierzehntägigen Kultivierung der humanen Knochenmarkszellen bei 37°C, 12,5% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank, erfolgte die Aussaat sowohl auf den zu untersuchenden Biomaterialien als auch auf Deckgläschen als Kontrollmaterial.

Hierzu wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer eine ca. 10 Millionen Zellen umfassende Menge Knochenmark/Mediumzellsuspension ermittelt und diese mit Hilfe einer sterilen Eppendorfpipette auf die Oberflächen der Deckgläschen bzw. der entsprechenden Biomaterialien, welche kurz vorher in 6-Lochplatten gegeben wurden, aufgebracht. Nach 30 Minuten, die dem Anhaften der Zellsuspension auf den Biomaterialoberflächen dienen sollten, erhielt jedes Loch der Platte 5 ml Medium sowie jeweils. Die Deckgläschen wurden in eine Petrischale gegeben und mit 2 ml Medium sowie jeweils 0,5 mg Interleukin III und GMCSF pro ml Medium überschichtet. Die Kultivierung der Knochenmarkszellen auf den Biomaterialien erfolgte analog der oben beschriebenen Knochenmarkszellkultur im Brutschrank mit viertägigem Medienwechsel.

#### **2.5 Methoden zur Analyse der Zellmorphologie, des Wachstumsverhaltens und der Differenzierungstendenz der humanen Knochenmarkszellen nach Kulti-vierung**

Zur qualitativen und quantitativen Beschreibung der Zellmorphologie und des Wachstums- und Differenzierungsverhaltens der kultivierten Knochenmarkszellen kamen teils histologische teils immunhistochemische Methoden, Licht- und Elektronenmikroskopie, Blots mit anschließender elektronischer Bildverarbeitung sowie die Technik der Durchflußzytometrie zur Anwendung.

Es handelte sich dabei im einzelnen um Methoden, die nachstehend beschrieben werden:

- Rasterelektronenmikroskopie
- Zellzählung nach Hämatoxylin Färbung mit Hilfe des OPTIMAS-Systems
- Test der Zellvitalität durch Acridin-Orange Färbung
- Auflichtmikroskopie nach Immunfluoreszenz- bzw. Alternativfärbung

- Durchflußzytometrie mittels FACS (Fluorescence Analysis Cell Sorter)
- Langzeitkultivierung von humanen Knochenmarkszellen
- Dot-Blot

### **2.5.1 Vorbereitung der Biomaterialien mit humanen Knochenmarkszellen zur Rasterelektronenmikroskopie**

Die für die Rasterelektronenmikroskopie vorgesehenen Biomaterialien wurden dem Brutschrank entnommen und nach Absaugen ihres Mediums mit einem Gemisch aus 23 ml Cacodylat-Puffer und 2 ml 2% Glutaraldehyd in PBS zwei Stunden bei Raumtemperatur fixiert. Nach jeweils dreimaligem Spülen für fünf Minuten mit PBS erfolgte eine Sekundärfixierung mit 1 %iger Osmiumsäure in 0,1 molarem Cacodylatpuffer für die Dauer von einer Stunde bei Raumtemperatur. Daran schloß sich die Entwässerung in aufsteigender Acetonreihe für je zehn Minuten in 50%, 75%, 90%, 95% und 100%igem Aceton bei Raumtemperatur an. Nach Trocknung der Proben in einer Critical-Point Kammer erfolgte die Goldbedampfung der Materialienoberflächen mit Hilfe des Sputter-Coaters.

Die so vorbereiteten Probenkörper wurden der Rasterelektronenmikroskopie zugeführt.

### **2.5.2 Zellzählung nach Hämatoxylin Färbung mit Hilfe des OPTIMAS-Systems**

Zur Herstellung der Hämatoxylin-Färbelösung wurde 1,5 g Hämatoxylin in 1000 ml Aqua dest. gelöst und mit 0,2 g Natriumjodat ( $\text{NaJO}_3$ ) und 50 g reinem Kalialaun versetzt. Nach Zugabe von 50 g Chloralhydrat und 1 g kristalliner Zitronensäure in die inzwischen blauviolette Lösung wurde der Farbumschlag nach rotviolett abgewartet und die Lösung vor Gebrauch filtriert.

In die so erstellte Färbelösung wurden die zu untersuchenden Probenkörper, die zuvor nach 14-tägiger Kulturdauer ihrem Medium entnommen und ausreichend mit Aqua dest. gespült worden waren, für 5 Minuten eingelegt. Daran schloß sich ein 10-minütiges Spülen unter fließendem Leitungswasser und die Lufttrocknung des Materials an.

Nun folgte die Betrachtung des Präparates in Auflichtmikroskopie sowie die Zellzählung mittels OPTIMAS. Die gefärbten Zellen erschienen dabei in blauer Farbe.

### **2.5.3 Test der Zellvitalität durch Acridin-Orange Färbung**

Dem Kulturmedium der Probenkörper wurde in PBS gelöstes und steril filtriertes Acridin-Orange in einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  hinzugegeben und es wurde für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach Abpipettieren der Acridin-Orange Lösung folgte ein 3 x 5-minütiges Spülen mit dem Medium. Innerhalb von Minuten schloß sich die Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop in Auflichttechnik an. Dabei zeigten avitale Zellen keine Fluoreszenz, während hingegen vitale Zellen gelb-grün fluoreszierten.

### **2.5.4 Auflichtmikroskopie nach Immunfluoreszenz- bzw. Alternativfärbung**

Zur Minimierung der Eigenfluoreszenz der auf den Biomaterialien kultivierten Knochenmarkszellen wurden die Probenkörper nach dem Absaugen des sie umgebenden Mediums kurz mit TBS gespült und anschließend wahlweise mit 2 %igem Paraformaldehyd für 3 Minuten, mit Aceton für 10 Minuten oder mit einem Gemisch aus 0,25 %igem Glutaraldehyd und 1,5 %igem Paraformaldehyd für 3 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Es folgten anschließend sowohl eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem direktmarkierten Antikörper als auch eine Alternativfärbung mit einem Antikörper und einem Osteokalzinmarker.

#### **2.5.4.1 Immunfluoreszenzfärbung**

Nach Fixierung der Präparate folgte zunächst ein 3 x 5-minütiges Spülen mit PBS. Anschließend wurde entsprechender 1:10 in PBS verdünnter CD-Antikörper (CD2, CD14, CD15, CD19) auf den Probenkörper aufgetragen und dieser bei 4 °C vor Licht geschützt über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Probenkörper 3 x 5 Minuten mit PBS gespült, in Glycerin-Gelatine (60% Glycerin in Aqua bidestillata) eingedeckelt und in Auflichttechnik mikroskopiert.

#### **2.5.4.2 Färbung mit einem Neu-Fuchsin Antikörper**

Ansatz für 1 Liter Tris Puffer Solution (TBS): 10g NaCl und 0,605g Sigma Trizma® Base in 1l Aqua bidestillata (pH = 7,6).

Neu-Fuchsin-Färbelösung: 0,05 M Tris-Puffer (pH = 8,7), 5% Neu-Fuchsin in 2 M HCl gelöst, 4%  $\text{NaNO}_2$  in Tris-Puffer (N,N-Dimethylformamid), 5 mg Naphtol-As-Bi-

Phosphat in 60 µl (100%ig) DMF. Die Lösung muß unmittelbar vor der Färbung angesetzt und filtriert werden.

Nach der Fixierung erfolgte:

- Inkubation mit dem 1. Antikörper (CD2, CD14, CD15, CD19) 1:150 verdünnt in TBS und 1% BSA über 24 h bei 4 °C;
- 3 x 5 Minuten Spülen mit TBS;
- Inkubation des 2. Antikörpers (Anti-mouse IgG-Biotin konjugiert) 1:150 verdünnt in TBS und 1% BSA und 4% HSP über 30 Min. bei Raumtemperatur (RT);
- Spülen mit TBS für 3 x 5 Minuten;
- Inkubation des 3. Antikörpers (Extravidin Alkalische Phosphatase konjugiert) 1:150 verdünnt in TBS und 1% BSA über 30 Min. bei RT;
- Spülen mit TBS (3 x 5 Min.);
- Sichtbarmachen mit Neu-Fuchsin Färbelösung;
- Abstoppen der Färbereaktion über 10 Min. mit Leitungswasser;
- Entwässern für jeweils 10 Min. in aufsteigender Alkoholreihe (80%, 90%, 95%, 100%);
- Trocknen der bearbeiteten Präparate an der Luft;
- Auflichtmikroskopie der zuvor in Depex eingedeckelten Präparate.

#### **2.5.4.3 Färbung mit einem OCG-4 Antikörper als Osteokalzinmarker**

Hierzu wurden dreiwöchig kultivierte Zellen direkt und nach 48-stündiger Inkubation mit Vitamin D<sub>3</sub> nach Fixierung in 2 %igem Paraformaldehyd für 3 Minuten bei Raumtemperatur wie folgt bearbeitet:

- 3 x 5 Min. Spülen mit PBS;
- Inkubation des 1. Antikörpers 1:50 verdünnt in PBS für 24 h bei RT;
- 3 x 5 Min. Spülen mit PBS;
- Inkubation des 2. Antikörpers (Anti-mouse IgG-biotin konjugiert) 1:100 verdünnt in PBS für 1 h bei RT;
- 3 x 5 Min. Spülen mit PBS;
- Inkubation des 3. Antikörpers (Extravidin FITC- konjugiert) 1:50 in PBS für 1 h bei RT;
- 3 x 5 Min. Spülen mit PBS;

- Mikroskopieren der Präparate in Auflichttechnik nach Eindeckeln in Glycerin-Gelatine.

### **2.5.5 Vorbereitung der Probenkörper für die FACS-Analyse**

Die für die Auswertung mit Hilfe eines FACS-Gerätes vorgesehenen zellbewachsenen Testkörper wurden am Tage der Analyse aus dem Brutschrank genommen, mit PBS versetzt und zunächst für 30-60 Minuten auf Eis gelegt, um ein Ablösen der den Biomaterialien anhaftenden Zellen zu forcieren.

Anschließend erfolgte ein manuelles Zellablösen, indem mit einer Pasteurpipette und einem Pileusball unter mehrmaligem Ansaugen und Ausspritzen die anhaftenden Zellen von der Testkörperoberfläche gelöst wurden.

Die so entstandene Zell/Medium-Suspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen aufgenommen, mit PBS und 2% BSA mit Ca und Mg aufgefüllt und für fünf Minuten bei 1800 U/min und 5 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Procedere ein weiteres Mal durchgeführt. Daran anschließend erfolgte die Inkubation für eine Stunde mit dem für die jeweilige Untersuchung vorgesehenen FITC-konjugierten CD-Antikörper sowie eine weitere Zentrifugation (180 U/min, 5 Min., 5 °C).

Proben, bei denen eine Vitalitätsprüfung vorgesehen war, wurden zusätzlich mit 50 µl Propidiumjodid versehen.

### **2.5.6 Auswertung mit dem FACS-Gerät**

Im Anschluß wurden die Zellproben mit Hilfe des FACS-Gerätes analysiert. Hierzu ermittelte das Gerät zunächst von jeder Probe eine Menge, die durchschnittlich 10.000 Zellen enthielt.

Das Funktionsprinzip des Cell-Sorters zeichnete sich dadurch aus, daß die zu untersuchende Zellprobe mittels Druckluft in vertikaler Richtung gesteuert wurde und von einem horizontal eingerichteten Laserstrahl erfaßt und nach Größe, Vitalität, Granulierung, Anzahl und Färbung unterschieden werden konnte. Die vom Laserstrahl ausgelenkten und von sechs optischen Detektoren registrierten Signale wurden an ein angeschlossenes Computersystem weitergeleitet, mit entsprechender FACS-Software verarbeitet und in Form von Zytogrammen und Histogrammen graphisch dargestellt.

### **2.5.7 Langzeitkultivierung von humanen Knochenmarkszellen**

Es erfolgte eine Präparation und Aussaat von humanen Knochenmarkszellen in zuvor beschriebener Technik sowohl auf Probenkörpern als auch auf mit 0,2%iger Gelatine beschichteten Deckgläschen mit entsprechender Kultivierung in 6-Lochplatten bzw. Petrischalen unter Zugabe von Medium und Wachstumsfaktoren in äquivalenten Konzentrationen.

Das beim dreitägigen Austausch gewonnene Medium wurde unter Raumtemperatur bei 2000 rpm 10 Minuten zentrifugiert, der entstandene Überstand dekantiert und für die spätere Dot-Blot Analyse bei -20 °C eingefroren. An der Langzeitkultur kamen folgende Versuche zur Anwendung:

- Antikörperfärbungen gegen CD-14 positive Zellen;
- Nachweis von Alkalischer Phosphatase direkt bzw. nach Stimulation mit Vitamin D<sub>3</sub>;
- Antikörperfärbungen zur Detektion von Osteokalzin-positiven Zellen;
- Modifizierte von Kossa-Versilberung zum Nachweis mineralisierter Gewebeanteile;
- Modifizierte Movat Pentachrom-Färbung zur Darstellung chondraler Ossifikationsstadien.

#### **2.5.7.1 Antikörperfärbungen gegen CD-14 positive Zellen**

Hierbei fand die bereits erläuterte Antikörperfärbung mittels Neu-Fuchsin erneute Anwendung.

#### **2.5.7.2 Nachweis von Alkalischer Phosphatase ohne bzw. nach Stimulation mit Vitamin D<sub>3</sub>**

Es wurden Knochenmarkszellen direkt bzw. nach 48-stündiger Inkubation mit Vitamin D<sub>3</sub> wie folgt behandelt:

- Fixation mit 2 %igem Paraformaldehyd für 3 Min. bei RT;
- 3 x 5 Min. Spülen mit TBS;
- Inkubation mit Neu-Fuchsin Färbelösung;
- 3 x 5 Min. Spülen mit TBS;
- Auflichtmikroskopie der Präparate.

### **2.5.7.3 Antikörperfärbungen zur Detektion von Osteokalzin-positiven Zellen**

Auch in diesem Fall kam die bereits erwähnte Färbung mit einem OCG-4 Antikörper als Osteokalzinmarker ein weiteres Mal zum Einsatz.

### **2.5.7.4 Modifizierte von Kossa-Versilberung zum Nachweis mineralisierter Gewebeanteile**

- Fixation in Methylalkohol (100%);
- 1 Min. Spülen in Aqua dest.;
- Einbringen in eine 5 %ige Silbernitratlösung für 45 Min. bei RT unter Ausschluß des Lichtes;
- 3 x 3 Min. Spülen in Aqua dest.;
- Reduktion in Natriumkarbonat-Formaldehydlösung für 2 Min. bei RT;
- Fixation in 5 %igem Natriumthiosulfat für die Dauer von 5 Min.;
- 10 Min. Spülen unter Leitungswasser;
- Entwässern für jeweils 10 Min. in aufsteigender Alkoholreihe (80%, 90%, 95%, 100%);
- Eindeckeln nach erfolgter Lufttrocknung der Präparate.

### **2.5.7.5 Modifizierte Movat Pentachrom-Färbung zur Darstellung chondraler Ossifikationsstadien**

- Fixation in 100 %igem Methylalkohol (5 Min., 20 °C);
- 3 x 5 Min. Spülen mit TBS;
- Färben mit Alcianblau (10 Min., RT);
- Spülen mit Leitungswasser (5 Min., RT);
- Stabilisieren in alkalischem Äthylalkohol (60 Min., RT);
- Spülen unter fließendem Leitungswasser (10 Min., RT);
- Eintauchen in Aqua bidestillata;
- Kernfärbung in Weigerts Eisenhämatoxylin (10 Min., RT);
- Spülen mit Aqua bidestillata;
- Wässern in Leitungswasser (15 Min., RT);
- Färben mit Brilliant Crocein-Säurefuchsin (13 Min., RT);
- Spülung mit 0,5% Essigsäure;
- Differenzieren mit 5% Phosphorwolframsäure (20 Min., RT);

- Spülen in 0,5% Essigsäure (2 Min., RT, Schüttler);
- Entwässern in 100% Äthylalkohol (3x5 Min., RT);
- Färben in Saffron du Gatinais (60 Min., RT);
- Spülen und Entwässern in 100% Äthylalkohol (3x5 Min., RT);
- Eindeckeln nach erfolgter Lufttrocknung der Präparate.

## **2.6 Nachweis von Bestandteilen der Extrazellulären Matrix mittels Dot-Blot Verfahren**

Es wurden drei verschiedene Probenkörper aus den Substanzklassen der Metalle, Kunststoffe und Keramiken über sechs Monate nach oben beschriebener Methode kultiviert und das bei den drei- bis viertägigen Medienwechseln anfallende Medium zur späteren Dot-Blot-Analyse gesammelt.

Für die Substanzklasse der Metalle kam ein Reintitan- sowie ein Ti6Al7Nb-ODH Probenkörper, für die der Kunststoffe und Keramiken sowohl ein Polyäthylen- als auch ein Hydroxylapatitkeramik-Prüfkörper zur Anwendung.

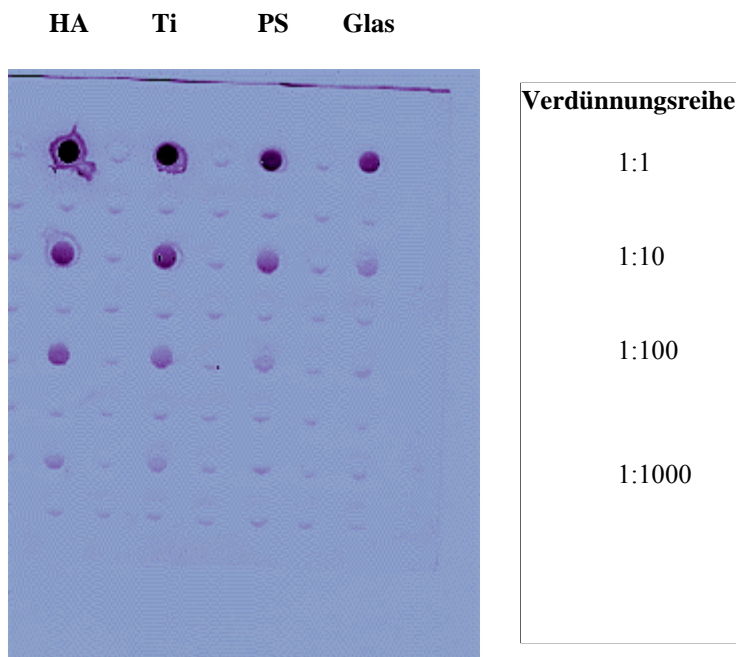
Unter Verwendung von Antikörpern wurde mit Hilfe der nachstehend beschriebenen Dot-Blot Methode das Vorhandensein von Alkalischer Phosphatase, Kollagen I und III sowie Osteokalzin überprüft.

Hierzu wurde zunächst das zu untersuchende Medium schonend aufgetaut und anschließend im Verhältnis 1:10, 1:100 und 1:1000 mit Tris buffer saline (TBS) verdünnt. Der Puffer bestand aus 10 g NaCl und 0,605 g Tris und besaß einen pH-Wert von 7,6.

Die Dot-Blot Apparatur bestand aus drei übereinander verschraubbaren Glasplatten mit einer in der Mitte der Platten befindlichen Celluloseacetatfolie, die durch zwei Gummiplatten von den Glasplatten getrennt wurde. Diese Apparatur verfügte über 96 Probenkammern zur Aufnahme des Mediums, das mittels einer angeschlossenen Wasserstrahlpumpe auf die Celluloseacetatfolie aufgebracht wurde.

Zunächst wurden je 400 µl Medium unverdünnt und in den oben beschriebenen Konzentrationen aufgebracht und mit 400 µl TBS nachgespült. Anschließend wurde die Celluloseacetatfolie der Dot-Blot Apparatur entnommen und in einer Plastikschiene auf einem Schüttler für zehn Minuten mit TBS gespült. Diese Schritte waren für alle Dot-Blot Untersuchungen gleich.





**Abb. 10:** Dot-Blot Analyse von Kollagen III im Überstand von humanen Knochenmarkzellkulturen nach zweiwöchiger Kultur auf HA, Ti, PS und Glas. Man sieht deutlich die starke Kollagen III-Sekretion im Fall von HA und Ti.

### Nachweis von Alkalischer Phosphatase

Nach zehnminütigem Spülen in TBS unter schnellem Schütteln erfolgte ein zwanzigminütiges Spülen unter langsamem Schütteln in TBS und einprozentiger Gelatine, woran sich ein 3 x 5 Minuten langes TBS-Spülen anschloß. Danach wurde zehn Minuten lang mit NBT/BCIP-Färbelösung unter langsamem Schütteln gefärbt, die Färbereaktion durch 2 x einminütiges Spülen mit Wasser gestoppt und anschließend die gefärbte Celluloseacetatfolie zwischen Filterpapier getrocknet.

Die NBT/BCIP-Färbelösung wurde kurz vor der Färbung auf folgende Weise angesetzt.

Zunächst wurde 75 mg Nitro-Blue Tetrazolium (NBT) in 1ml 70 %igem Dimethylformamid sowie 50 mg 5-Bromo-4 chloro-indolylphosphat (BCIP) in 1ml 100 %igem Dimethylformamid gelöst. Dann folgte der colour-buffer, der aus 100 mM Tris, 100 mM NaCl und 5mM MgCl<sub>2</sub> besteht. Die eigentliche Färbelösung bestand aus 200µl NBT und 150 µl BCIP gelöst in 50 ml colour-buffer.

### **Nachweis von Kollagen I**

Nachdem mit TBS und anschließend für zwanzig Minuten mit einer Lösung aus 50 ml TBS, 1 g Milchpulver und 0,05 g SDS (Sodium Docecylsulfat) gespült wurde, erfolgte eine Inkubation unter langsamem Schütteln über Nacht mit Milchpulverlösung (wie oben beschrieben) und 20 µl Rabbit-anti human collagen type 1 Antikörper.

Im Anschluß an die nächtliche Inkubation und das anschließende Spülen mit TBS 3 x 5 Minuten lang, wurde die Celluloseacetatfolie für zwei Stunden in die Milchpulverlösung zusammen mit 20 µl anti rabbit IgG-biotin F<sub>(ab'2)</sub> fragment gegeben. Nach weiterem Spülen mit TBS (3 x 5 Minuten) erfolgte die dritte Inkubation mit 20 µl Streptavidin POD konjugiertem Antikörper in Milchpulverlösung, ebenfalls zwei Stunden lang. Während dieser Zeit wurde die Lösung für die anschließende Chloronaphtolfärbung vorbereitet. Zunächst entstand die Stocklösung aus 30 mg in 2 ml Ethanol gelöst und in 95 ml 0,05 M Tris Puffer (pH=7,6) aufgenommenem 4-Chloro-1-naphtol, von der 10 ml kurz vor dem Färben mit 10 µl 30 %igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur eigentlichen Färbelösung vermischt und anschließend filtriert wurden.

Am Ende der dritten Inkubation erfolgte eine letzte 3 x 5-minütige TBS-Spülung und es schloß sich die Chloronaphtolfärbung an, die zehn Minuten dauerte. Am Ende folgten eine Stoppreaktion mit Leitungswasser (2 x 1 Minute) und die Trocknung der Folie zwischen Filterpapier.

### **Nachweis von Kollagen III:**

Das Procedere zum Nachweis von Kollagen III war mit dem Vorgehen zum Nachweis von Kollagen I identisch; es wurde jedoch mit einem anderen Erstantikörper über Nacht inkubiert. Dabei handelte es sich um RBT-collagen III.

### **Nachweis von Osteokalzin:**

Nach 10-minütigem TBS-Spülen wurde anschließend für 20 Minuten mit 0,1 %iger Gelatine in TBS und danach für 3 x 5 Minuten mit TBS gespült. Es folgte eine Inkubation über Nacht mit 0,5 g BSA und 20 µl Mab to Osteocalcin human Antikörper in 50 ml TBS. Am nächsten Tag wurde nach dem obligaten TBS-Spülen für zwei Stunden mit 20 µl anti mouse IgG biotin conjugate Antikörper und 0,5 g BSA in 50 ml TBS inkubiert. Nach dem Spülen erfolgte die dritte Inkubation für zwei Stunden mit 20

µl Streptavidin POD konjugiert in dem bereits beschriebenen BSA/TBS-Gemisch. Es folgten TBS-Spülen, Chloronaphtolfärbung, Stoppreaktion mit Leitungswasser und Trocknen zwischen Filterpapier, wie zuvor eingehend beschrieben.

#### **Auswertung der Dot-Blots:**

Die unterschiedlichen Färbungsgrade der Dot-Blots wurden mittels einer Farbvideokamera und einem Bildverarbeitungsprogramm erfaßt und mit Hilfe von Helligkeitswerten im Bereich von 0 (entspricht der Farbe Schwarz) bis 250 (entspricht der Farbe Weiß) unter Anwendung eines Tabellenkalkulationsprogramms auf einem Personal Computer verarbeitet. Die unterschiedlichen Färbungsgrade erlaubten dabei Rückschlüsse auf die Menge der gebundenen Antikörper. Es erfolgte eine graphische Darstellung der Ergebnisse.

#### **Graphische Darstellung der Dot-Blot Analyse:**

Die erstellten Liniendiagramme weisen für die oben beschriebenen Verdünnungsgrade vier verschiedene Graphen auf. Die Ordinate beinhaltet die Intensität der gemessenen Helligkeitswerte, die in abnehmender Größe zunehmende Färbung und damit vermehrte Antikörperbindung bedeutet. Auf der Abszisse befinden sich die Werte für die Dauer der Zellkultur vom ersten bis zum 64. Kulturtag.

#### **Statistik:**

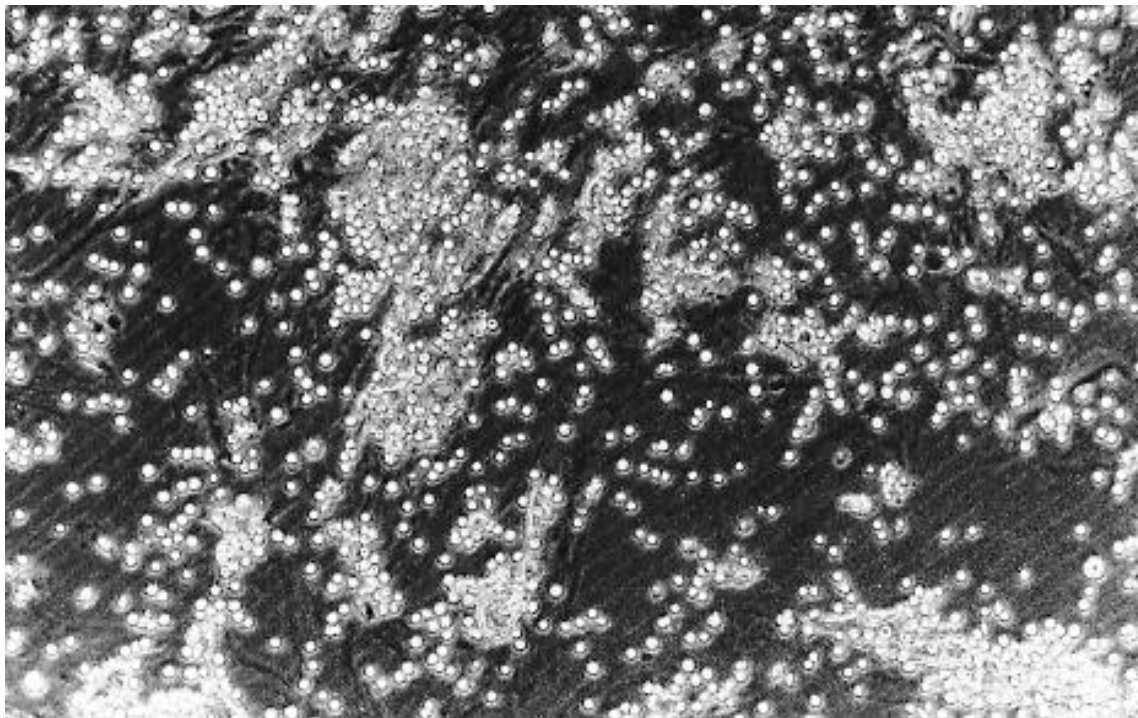
Die Messungen der Proben bezüglich Zellzahlen und Zelldifferenzierungen zeigten eine Normalverteilung (Kolmogrov-Smirnov). Eine Varianzanalyse wurde durchgeführt, um die Signifikanz der Ergebnisse der verschiedenen Biomaterialien zu evaluieren. Dazu wurde der Whitney-Mann-Test benutzt.

### 3. Ergebnisse

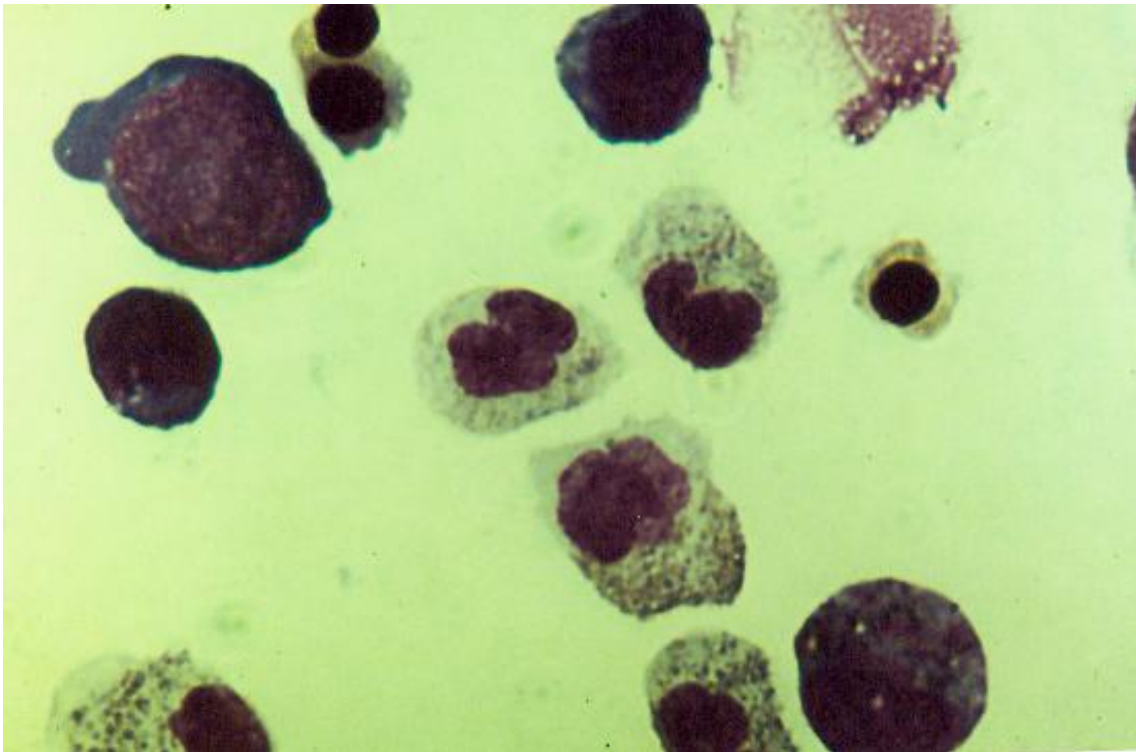
Die unter Material und Methode beschriebene Knochenmarkszellkultur unterlag im Rahmen der erforderlichen Kulturversorgung einer ständigen Überwachung hinsichtlich ihrer lichtmikroskopischen Zellmorphie, ihrer Zellvitalität sowie etwaiger Verunreinigungen wie z.B. bakteriellen Ursprungs.

Mit zunehmender Kulturdauer zeigte sich ein sich verdichtender, einschichtiger Zellrasen (Monolayer) auf den Kontrolldeckgläschen, der ab dem vierten Kulturtag morphologische Veränderungen der bei der Aussaat noch kreisrunden Zellen in Richtung ovaler bis länglicher Zellkörper sowie teilweise auch Clusterbildung aufwies.

In Anlehnung an die Ergebnisse von Kalla (Kalla et. al., 1991) und Wilke (Wilke et al., 1992) konnte in Pappenheim-Färbungen der Kontrollkulturen eine der physiologischerweise im menschlichen Knochenmark vorhandene Zusammensetzung der weißen Zellreihe nachgewiesen werden (Abb. 12).



**Abb. 11:** Dichter Zellbewuchs in der Kulturflasche kurz vor der Zellentnahme.



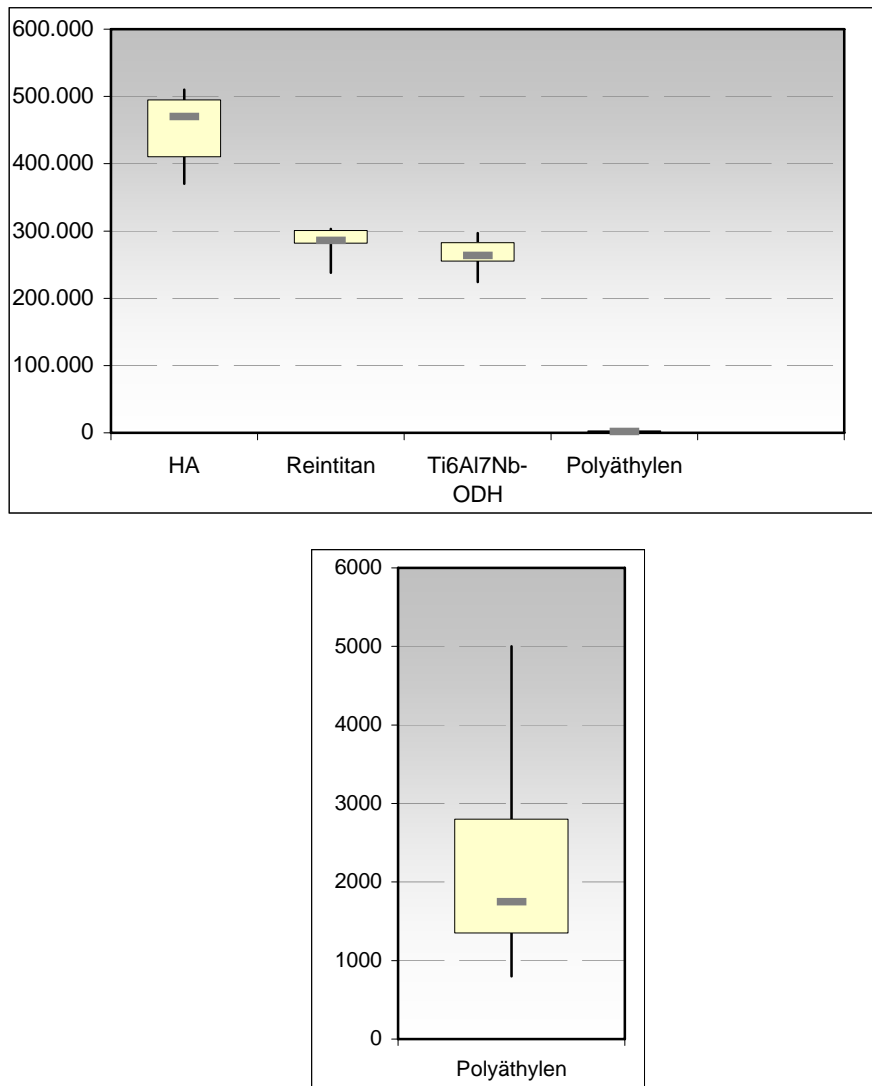
**Abb.12:** Zellausstrich nach 14 Tagen Kulturdauer, Pappenheim-Färbung, Durchlichttechnik. Es lassen sich verschiedene Zellen des Blutes differenzieren: Lymphozyten (LY), Normoblasten (NO), Stabkernige Granulozyten (SG), Proerythroblast (PB), Promyelozyten (PM) und Metamyelozyten (MM), Vergrößerung ca. 950-fach.

### **3.1 Zellzählung nach Hämatoxylin Färbung mit Hilfe des OPTIMAS-Systems**

Die mit Hilfe des Optimas-Systems ermittelten Werte für Gesamtzellzahlen (Mittelwerte aus 10 Experimenten) nach Hämatoxylinfärbung zeigten die durchschnittlich größte Zellzahl in der Gruppe der Keramiken. An zweiter Stelle befanden sich die Metalle, bei denen kein signifikanter Unterschied zwischen Reintitan und den Titanlegierungen zu verzeichnen war. Den Schluß bildeten die Kunststoffe, die die geringste Anzahl an Zellen auf den getesteten Materialoberflächen aufwiesen.

Mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests für unverbundene Stichproben wurden signifikante Unterschiede zwischen den getesteten Materialien im Hinblick auf ihre Zellzahl statistisch nachgewiesen. Dabei zeigten sich z.T. hoch signifikante Unterschiede ( $\alpha < 0,01$ ). Nachstehend befinden sich ein Diagramm und eine Tabelle mit den ermittelten Zellzahlen einschließlich ihrer Mittelwerte, Standardabweichungen und Varianzen sowie ein Beispiel für die Durchführung des Mann-Whitney-Test zur Bestimmung des Signifikanzniveaus.

## Ergebnisse



**Abb. 13:** Quantitative Analyse der den Prüfkörpern anhaftenden Zellen (Optimas-System/ Durchschnittliche Zellzahl von 10 Versuchen)

Material	Zellzahl (Mittelwert)	Standard- abweichung	Varianz
HA-Keramik	450	52,5	2755,5
Reintitan	280	29,05	844,4
Ti6Al7Nb-ODH	260	24,13	582,22
Polyäthylen	2	1,3	1,7

**Tab.1:** Durchschnittliche Zellzahl, Standardabweichung und Varianz (in 1000) der getesteten Biomaterialien.

Zellzahl		Rangnummern	
HA-Keramik	Polyäthylen	HA-Keramik	Polyäthylen
380.000	2000	12	7
510.000	3300	20	9
420.000	5000	14	10
370.000	900	11	2
490.000	1900	17,5	6
490.000	1100	17,5	3,5
400.000	2300	13	8
470.000	800	15,5	1
500.000	1600	19	5
470.000	1100	15,5	3,5
m = 10	n = 10	$\sum R_1 = 142,013$	$\sum R_2 = 55$

**Tab. 2:** Vergleich zweier Stichproben bei ordinalen Daten mittels des Wilcoxon-Tests am Beispiel der Biomaterialien Hydroxylapatit-Keramik und Polyäthylen (m,n: Variablen für Stichprobenumfang;  $R_1$ ,  $R_2$ : ermittelte Rangnummern).

### Wilcoxon Formel

$$U_1 = m \cdot n + 0,5 \cdot m \cdot (m+1) - R_1$$

$$U_2 = m \cdot n + 0,5 \cdot m \cdot (m+1) - R_2$$

Werte in Formel eingesetzt:  $U_1 = 10 \cdot 10 + 0,5 \cdot 10 \cdot (10+1) - 142,013 = 12,987$

$$U_2 = 10 \cdot 10 + 0,5 \cdot 10 \cdot (10+1) - 55 = 100$$

Als Prüfgröße U gilt:  $U = \min(U_1, U_2) = 12,987$

Ist  $U \leq U^*$ , so gilt bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$ , daß die Zellzahlen voneinander verschieden sind.

**Kritische Werte für  $U^*$  bei m, n = 10**

# Ergebnisse

Hoch signifikant	signifikant	mäßig signifikant	schwach signifikant
$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,05$	$\alpha = 0,10$	$\alpha = 0,20$
16	23	27	32

**$U < U^* \Rightarrow$  Die Zellzahlen sind hochsignifikant voneinander verschieden.**

Zellzahl		Rangnummern	
HA-Keramik	Reintitan	HA-Keramik	Reintitan
380.000	303.000	12	10
510.000	302.000	20	9
420.000	299.000	14	8
370.000	297.000	11	7
490.000	288.000	17,5	6
490.000	284.000	17,5	5
400.000	279.000	13	4
470.000	277.000	15,5	3
500.000	265.000	19	2
470.000	238.000	15,5	1
m = 10	n = 10	$\sum R_1 = 142,013$	$\sum R_2 = 55$

**HA/Reintitan:  $\alpha = 0,01$  hoch signifikant**



Ergebnisse

Zellzahl		Rangnummern	
HA-Keramik	Ti6Al7Nb-ODH	HA-Keramik	Ti6Al7Nb-ODH
380.000	265.000	12	6
510.000	290.000	20	9
420.000	233.000	14	2
370.000	248.000	11	4
490.000	275.000	17,5	8
490.000	268.000	17,5	7
400.000	262.000	13	5
470.000	297.000	15,5	10
500.000	238.000	19	3
470.000	224.000	15,5	1
m = 10	n = 10	$\sum R_1 = 142,013$	$\sum R_2 = 55$

**HA/Ti6Al7Nb-ODH: a= 0,01 hoch signifikant**

Ergebnisse

Zellzahl		Rangnummern	
Ti6Al7Nb-ODH	Reintitan	Ti6Al7Nb-ODH	Reintitan
265.000	303.000	7,5	20
290.000	302.000	15	19
233.000	299.000	2	18
248.000	297.000	5	16,5
275.000	288.000	10	14
268.000	284.000	9	13
262.000	279.000	6	12
297.000	277.000	16,5	11
238.000	265.000	3,5	7,5
224.000	238.000	1	3,5
m = 10	n = 10	$\sum R_1 = 75,5$	$\sum R_2 = 134,5$

**Reintitan/Ti6Al7Nb-ODH:  $\alpha = 0,05$  signifikant**

# Ergebnisse

Zellzahl		Rangnummern	
Reintitan	Polyäthylen	Reintitan	Polyäthylen
303.000	2000	20	7
302.000	3300	19	9
299.000	5000	18	10
297.000	900	17	2
288.000	1900	16	6
284.000	1100	15	3,5
279.000	2300	14	8
277.000	800	13	1
265.000	1600	12	5
238.000	1100	11	3,5
m = 10	n = 10	$\sum R_1 = 155$	$\sum R_2 = 55$

**Reintitan/Polyäthylen:  $\alpha = 0,01$  hoch signifikant**

Zellzahl		Rangnummern	
Ti6Al7Nb-ODH	Polyäthylen	Ti6Al7Nb-ODH	Polyäthylen
265.000	2000	16	7
290.000	3300	19	9
233.000	5000	12	10
248.000	900	14	2
275.000	1900	18	6
268.000	1100	17	3,5
262.000	2300	15	8
297.000	800	20	1
238.000	1600	13	5
224.000	1100	11	3,5
m = 10	n = 10	$\sum R_1 = 155$	$\sum R_2 = 55$

**Ti6Al7Nb-ODH/Polyäthylen:  $\alpha = 0,01$  hoch signifikant**

### 3.2 Test der Zellvitalität durch Acridin-Orange Färbung

Mit Hilfe des frei durch Biomembranen permeablen, hydrophoben Farbstoffs Acridin-Orange wurde eine einfache grobe Bestimmung der Vitalität der den Probenkörpern anhaftenden Zellen durchgeführt. So zeigten sich im Falle der Hydroxylapatitkeramik die fluoreszendierenden Partikel deutlich in den Lysosomen der anhaftenden Zellen, gefolgt im Falle des Reintitans und der verwandten Titanlegierung. Sehr viel schlechter war dies bei dem getesteten Kunststoffkörper nachweisbar, wo sich nur vereinzelt die Lysosomen mit Akridin Orange anfärbten.

Eine wesentlich genauere Methode der Analyse der Zellvitalität fand mit Hilfe der Durchflußzytometrie nach Zugabe von Propidiumjodid statt.

### 3.3 Durchflußzytometrie mittels FACS (Fluorescence Analysis Cell Sorter)

Jeweils 10 Probenkörper eines jeden Biomaterials fanden Zugang zur FACS-Analyse, welche 5.000 anheftende Zellen pro Probenkörper berücksichtigte.

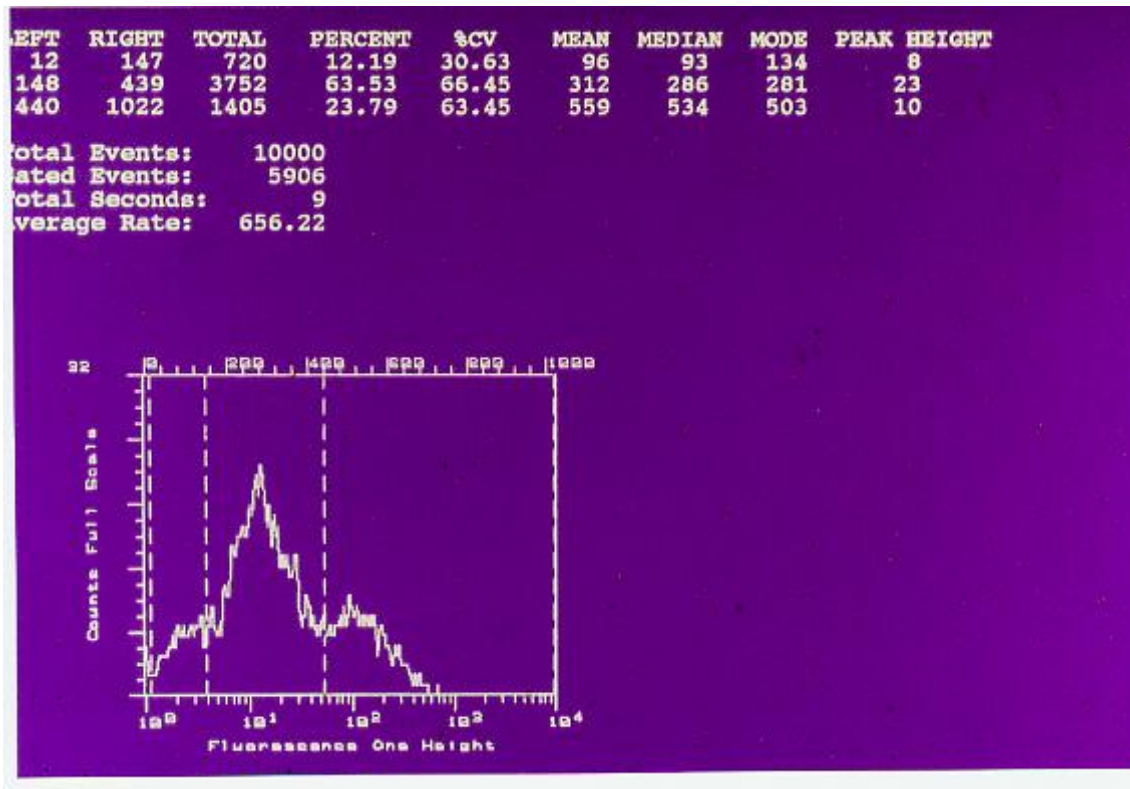
Zunächst wurde die Zahl avitaler Zellen in Bezug auf die verschiedenen Materialien mit Hilfe von Propidiumjodid überprüft. Zellen mit einem Membrandefekt nehmen dabei den Farbstoff auf und signalisieren nach entsprechender Filtereinstellung im FACS ihren avitalen Zustand. Dabei zeichneten sich deutliche Diskrepanzen zwischen den einzelnen Biomaterialien ab. Ein Ergebnis, das sich bereits tendenziell bei der zuvor erwähnten Färbung mit Akridin-Orange abzeichnete. Die meisten vitalen Zellen fanden sich bei den Keramiken, während die Polymere die meisten toten Zellen aufwiesen.

### 3.3.1 Kontrollkultur auf kultivierten Deckgläschen

Die Kontrollkultur ohne Kontakt zu den verschiedenen Biomaterialien zeigte am Tag der Präparation sowie nach zweiwöchiger Kultivierung relativ ähnliche Populationen an CD-positiven Zellen.

Deckgläschen	Tag 0	Tag 14
CD2 (T-Lymphozyten)	12,5%	14,3%
CD14 (Monozyten)	24,1%	20,1%
CD15 (Granulozyten)	25,9%	20,3%
CD19 (B-Lymphozyten)	11,9%	10,2%
tote Zellen	2,1%	4,8%

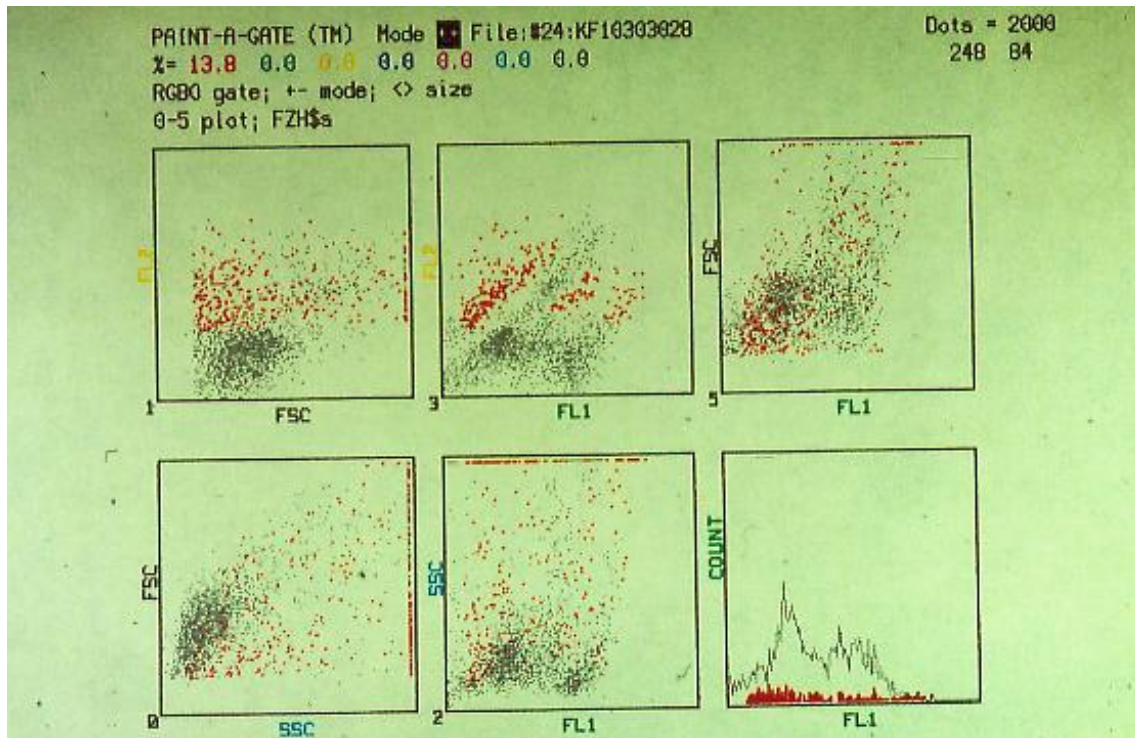
**Tab. 3:** Anteil verschiedener Knochenmarkszellen vor und nach 14-tägiger Kultivierung auf Glasplättchen. Bei allen nachfolgenden %-Angaben handelt es sich um Mittelwerte aus 10 Versuchen.



**Abb. 14:** Zytogramm (FACS-Gerät). Knochenmarkszellkultur auf Deckgläschen, Vitalitätskontrolle (Tag 0). Der prozentuale Anteil avitaler Zellen betrug hier 2,1%.

### Legende

- die mit Propidiumjodid (ein an DNA anlagernder Farbstoff) markierten avitalen Zellen stellen sich rot dar
- das FACS-Gerät stellt registrierte avitale Zellen in Relation zu jeweils zwei Photodetektoren dar und demonstriert ihre Position im jeweiligen Zytogramm
- FL1                                      Photodetektor für grüne Fluoreszenz
- FL2                                      Photodetektor für rote Fluoreszenz
- SSC (Side Scatter)                      seitlich ausgerichteter Photodetektor
- FSC (Forward Scatter)                  frontal ausgerichteter Photodetektor
- Count                                      gezählte Zellpopulation



**Abb. 15:** Histogramm. Knochenmarkszellkultur auf Deckgläschen (Tag 0) nach Antikörperfärbung zur Detektion CD2-positiver Zellen (T-Lymphozyten). Der prozentuale Anteil der T-Lymphozyten betrug hier 12,61%.

### Legende

- das Histogramm zeigt zwei durch eine Markierung getrennte Regionen, in denen zwei Peaks zur Darstellung kommen
- beide Regionen sind nach Analyse einer Kontrollprobe von Knochenmarkszellen ohne Antikörper festgelegt worden
- die Einteilung in zwei Regionen ist möglich, weil sich bei der Untersuchung der Kontrollprobe ohne Antikörper eine meßbare Eigenfluoreszenz der unmarkierten Zellpopulation ergab
- nach dem Festsetzen einer diese Eigenfluoreszenz eingrenzende Markierung (Gate), ist es möglich, bei nachfolgend durchgeführter Analyse der mit einem Antikörper inkubierten Probe eine von der Eigenfluoreszenz (Region 1) unterscheidbare Fluoreszenz (Region 2) zu ermitteln.

LEFT	Position der "links" eingrenzenden Markierung einer Region
RIGHT	Position der "rechts" eingrenzenden Markierung einer Region
TOTAL	gemessene Zellzahl einer Region
PERCENT	Prozentualer Anteil der in einer Region registrierten Zellzahl bezogen auf "Gated Events"
%CV	Variationskoeffizient einer Region
MEAN	arithmetisches Mittel einer Region
MEDIAN	statistisch mittlerer Wert einer Region
MODE	statistisch höchster Wert einer Region
PEAK HEIGHT	Ausschlaghöhe eines Peaks in einer Region
Total Events	vorher festgelegte zu messende Zellzahl
Gated Events	tatsächlich in die Analyse einbezogene Zellpopulation
Total Seconds	Meßzeit
Average Rate	registrierte Zellzahl pro Sekunde

Die Vorauswahl mittels "Gated Events" erfolgte anhand eines Zytogramms, das die Verteilung der Zellen in der zu analysierenden Probe nach Größe und Granulierung darstellte.

### 3.3.2 Vitalität

Die Zahl der durch die Inkubation mit Propidiumjodid gekennzeichneten toten Zellen betrug nach 14 Tagen Kulturdauer 8,1% bei den Keramikpräparaten. Avitale Zellen auf der Titanlegierung waren zu 9%, bei Reintitan zu 8,6% zu finden. Ein signifikanter Unterschied zeichnete sich im Vergleich des Polyäthylenpräparates mit der Keramik und dem Titan sowie dessen Legierung ab. Hier wurde ein Signifikanzniveau von  $\alpha < 0.01$  erreicht.



Material	Zahl der toten Zellen
Hydroxylapatit-Keramik	8,1%
Reintitan	8,6%
Ti6Al7Nb-ODH	9%
Polyäthylen	15,9%
Glas (Kontrolle)	4,8%

**Tab. 4:** Prozentualer Anteil der toten Zellen auf den verschiedenen Biomaterialien nach 14-tägiger Kulturdauer (identifiziert durch Propidiumjodid-Färbung).

Material	Signifikanzniveau
Hydroxylapatit-Keramik/Reintitan	$\alpha > 0,2$
Hydroxylapatit-Keramik/Ti6Al7Nb-ODH	$\alpha > 0,2$
Hydroxylapatit-Keramik/Polyäthylen	$\alpha < 0,01$
Reintitan/Ti6Al7Nb-ODH	$\alpha > 0,2$
Reintitan/Polyäthylen	$\alpha < 0,01$
Ti6Al7Nb-ODH/Polyäthylen	$\alpha < 0,01$
Biomaterialien/Kontrolle	$\alpha < 0,01$

**Tab.5:** Signifikanzniveau der toten Zellen auf den verschiedenen Biomaterialien nach 14-tägiger Kulturdauer.

### 3.3.2.1 T-Lymphozyten (CD 2)

Im Hinblick auf den Gehalt an T-Lymphozyten, die durch einen CD2-Antikörper markiert wurden, zeigte sich ein einheitliches Bild von durchschnittlich 11% positiv markierter Zellen. Im Vergleich zur Kontrollkultur waren auf den verschiedenen Biomaterialien nach 14 Tagen weniger CD2-positive Zellen zu finden als auf den Deckgläschen ( $\alpha < 0,05$ ). )

Material	CD2-positive Zellen (T-Lymphozyten)	Standard- abweichung	Varianz	Kontrolle (Glas)
Hydroxylapatit-Keramik	10,8%	75,79	5325,33	14,3%
Reintitan	10,5%	123,19	15177,11	14,3%
Ti6Al7Nb-ODH	10,5%	108,38	11747,33	14,3%
Polyäthylen	11,6%	159,57	25465,28	14,3%

**Tab. 6:** Prozentualer Anteil der CD2-positiven Zellen auf den verschiedenen Biomaterialien nach 14-tägiger Kulturdauer.

Material	Signifikanzniveau
Hydroxylapatit-Keramik/Reintitan	$\alpha > 0,2$
Hydroxylapatit-Keramik/Ti6Al7Nb-ODH	$\alpha > 0,2$
Hydroxylapatit-Keramik/Polyäthylen	$\alpha > 0,2$
Reintitan/Ti6Al7Nb-ODH	$\alpha > 0,2$
Reintitan/Polyäthylen	$\alpha > 0,2$
Ti6Al7Nb-ODH/Polyäthylen	$\alpha > 0,2$
Biomaterialien/Kontrolle	$\alpha < 0,05$

**Tab. 7:** Signifikanzniveau der CD2-positiven Zellen auf den verschiedenen Biomaterialien nach 14-tägiger Kulturdauer.

### 3.3.2.2 Monozyten (CD 14)

Der prozentuale Anteil CD14-positiver Zellen betrug 20,2% auf den Keramiken, 18,6% auf Reintitan, 19,3% auf der Titanlegierung und 22,1% auf der Oberfläche von Polyäthylen. Der Gehalt an Monozyten war auf den Keramiken höher als beim Reintitan und der Titanlegierung wie auch auf Glas als Kontrolle ( $\alpha < 0.05$ ). Auch auf dem

Polyäthylenprobenkörper fanden sich mehr Monozyten als in der Kontrolle und den beiden Metallwerkstoffen ( $\alpha < 0.05$ ).

Material	CD14-positive Zellen (Monozyten)	Standard-abweichung	Varianz	Kontrolle (Glas)
Hydroxylapatit-Keramik	20,2%	229,83	52821,95	20,1%
Reintitan	18,6%	276,71	76572,9	20,1%
Ti6Al7Nb-ODH	19,4%	235,12	55283,83	20,1%
Polyäthylen	22,1%	181,25	32853,34	20,1%

**Tab. 8:** Prozentualer Anteil der CD14-positiven Zellen auf den verschiedenen Biomaterialien nach 14-tägiger Kulturdauer.

Material	Signifikanzniveau
Hydroxylapatit-Keramik/Reintitan	$\alpha < 0,05$
Hydroxylapatit-Keramik/Ti6Al7Nb-ODH	$\alpha < 0,05$
Hydroxylapatit-Keramik/Polyäthylen	$\alpha < 0,01$
Reintitan/Ti6Al7Nb-ODH	$\alpha > 0,2$
Reintitan/Polyäthylen	$\alpha < 0,01$
Ti6Al7Nb-ODH/Polyäthylen	$\alpha < 0,01$
Biomaterialien/Kontrolle	$\alpha < 0,05$

**Tab. 9:** Signifikanzniveau der CD14-positiven Zellen auf den verschiedenen Biomaterialien nach 14-tägiger Kulturdauer.

### 3.3.2.3 Granulozyten (CD 15)

Deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Biomaterialien zeigten sich jedoch bei den mit CD15 markierten Granulozyten, die am häufigsten auf den Oberflächen der

Kunststoffe und am wenigsten bei den Keramiken zu finden waren ( $\alpha < 0.01$ ). Im Hinblick auf die Kontrollkultur zeigten sich insgesamt mehr CD15-positive Zellen auf den Deckgläschen als auf den Keramikoberflächen ( $\alpha < 0.01$ ) und den übrigen Materialien. Polyäthylenproben wiesen mehr Granulozyten auf als die Hydroxylapatitkeramik ( $\alpha < 0.01$ ), das Reintitan und die Titanlegierung.

Material	CD15-positive Zellen (Granulozyten)	Standardabweichung	Varianz	Kontrolle (Glas)
Hydroxylapatitkeramik	10,3%	72,79	5325,33	20,3%
Reintitan	12,2%	254,69	64869,55	20,3%
Ti6Al7Nb-ODH	13,2%	267,46	71540,1	20,3%
Polyäthylen	17,3%	159,44	25421,65	20,3%

**Tab. 10:** Prozentualer Anteil der CD15-positiven Zellen auf den verschiedenen Biomaterialien nach 14-tägiger Kulturdauer.

Material	Signifikanzniveau
Hydroxylapatit-Keramik/Reintitan	$\alpha < 0,01$
Hydroxylapatit-Keramik/Ti6Al7Nb-ODH	$\alpha < 0,01$
Hydroxylapatit-Keramik/Polyäthylen	$\alpha < 0,01$
Reintitan/Ti6Al7Nb-ODH	$\alpha > 0,2$
Reintitan/Polyäthylen	$\alpha < 0,01$
Ti6Al7Nb-ODH/Polyäthylen	$\alpha < 0,01$
Biomaterialien/Kontrolle	$\alpha < 0,01$

**Tab. 11:** Signifikanzniveau der CD15-positiven Zellen auf den verschiedenen Biomaterialien nach 14-tägiger Kulturdauer.

### 3.3.2.4 B-Lymphozyten (CD 19)

Ähnlich verhielt es sich beim Nachweis von B-Lymphozyten (CD19), die die größte Anzahl bei den Polymeren, die kleinste im Falle der Hydroxylapatitkeramiken aufwiesen. Im Vergleich zur Kontrollkultur zeigten sich Unterschiede bei den Keramiken und Polymeren, während die Titanverbindungen ähnliche Zellzahlen zeigten.

Material	CD19-positive Zellen (B-Lymphozyten)	Standard-abweichung	Varianz	Kontrolle (Glas)
Hydroxylapatit-Keramik	9,5%	102,62	10531,51	10,2%
Reintitan	10,1%	422,46	6925,43	10,2%
Ti6Al7Nb-ODH	10,8%	158,38	25084,71	10,2%
Polyäthylen	15,9%	282,02	79535,43	10,2%

**Tab. 12:** Prozentualer Anteil der CD19-positiven Zellen auf den verschiedenen Biomaterialien nach 14-tägiger Kulturdauer.

Material	Signifikanzniveau
Hydroxylapatit-Keramik/Reintitan	$\alpha=0,1$
Hydroxylapatit-Keramik/Ti6Al7Nb-ODH	$\alpha=0,1$
Hydroxylapatit-Keramik/Polyäthylen	$\alpha=0,01$
Reintitan/Ti6Al7Nb-ODH	$\alpha=0,2$
Reintitan/Polyäthylen	$\alpha=0,01$
Ti6Al7Nb-ODH/Polyäthylen	$\alpha=0,01$
Reintitan/Ti6Al7Nb-ODH/Kontrolle	$\alpha>0,2$
Polyäthylen/Kontrolle	$\alpha<0,01$
Hydroxylapatit-Keramik/Kontrolle	$\alpha=0,1$

**Tab. 13:** Signifikanzniveau der CD19-positiven Zellen auf den verschiedenen Biomaterialien nach 14-tägiger Kulturdauer.

### 3.3.2.5 Osteokalzin

Nach Inkubation mit einem Antikörper gegen Osteokalzin zeigte die FACS-Analyse lediglich 1% positive Zellen bei den Polymeren, während die Hydroxylapatitkeramiken ca. 5% Osteokalzin-positive Zellen auf ihren Oberflächen aufwiesen .

Material	Osteokalzin-positive Zellen
Hydroxylapatit-Keramik	4,9%
Reintitan	4,1%
Ti6Al7Nb-ODH	4,1%
Polyäthylen	1,3%
Glas (Kontrolle)	2,2%

**Tab. 14:** Prozentualer Anteil der Osteokalzin-positiven Zellen auf den verschiedenen Biomaterialien nach 14-tägiger Kulturdauer.

Material	Signifikanzniveau
Hydroxylapatit-Keramik/Reintitan	$\alpha > 0,2$
Hydroxylapatit-Keramik/Ti6Al7Nb-ODH	$\alpha < 0,2$
Hydroxylapatit-Keramik/Polyäthylen	$\alpha < 0,01$
Reintitan/Ti6Al7Nb-ODH	$\alpha > 0,2$
Reintitan/Polyäthylen	$\alpha < 0,01$
Ti6Al7Nb-ODH/Polyäthylen	$\alpha < 0,01$
Biomaterialien//Kontrolle	$\alpha < 0,01$

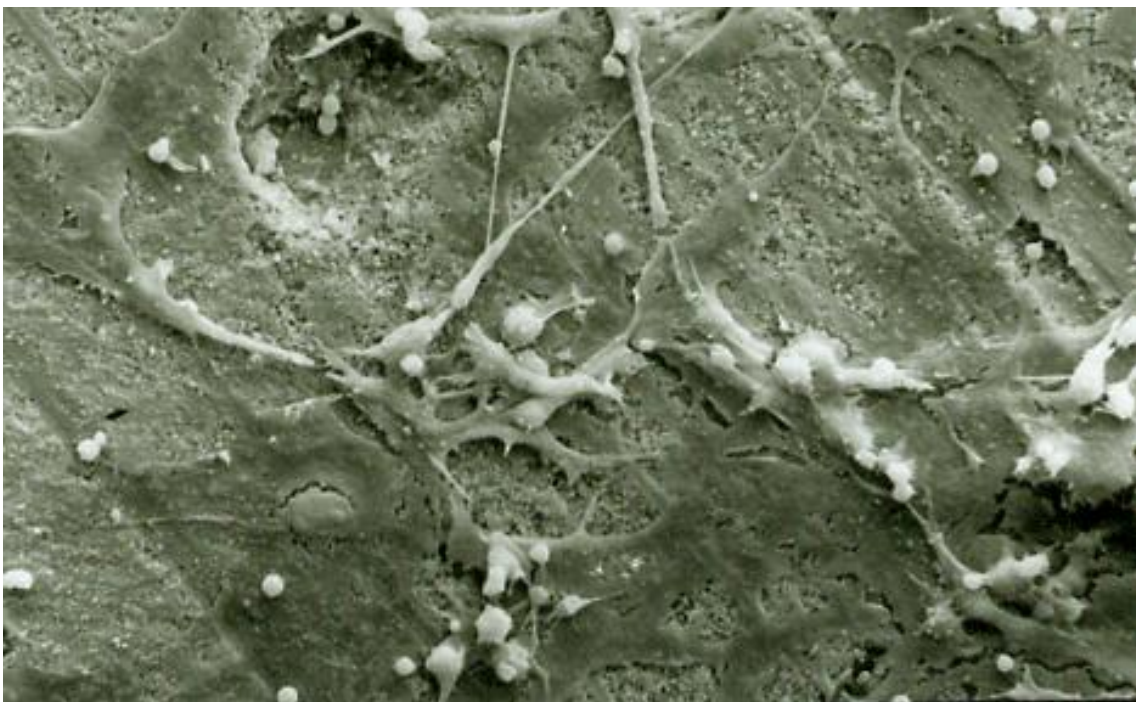
**Tab.15:** Signifikanzniveau der Osteokalzin-positiven Zellen auf den verschiedenen Biomaterialien nach 14-tägiger Kulturdauer.

### **3.4 Rasterelektronenmikroskopie der mit Knochenmarkszellen kultivierten Biomaterialien**

In der durchgeführten Rasterelektronenmikroskopie zeigten sich deutliche materialbedingte Unterschiede zwischen den einzelnen Probenkörpern im Hinblick auf die vorhandene Zellzahl und die Ausbildung extrazellulärer Strukturen.

#### **3.4.1 Hydroxylapatitkeramik**

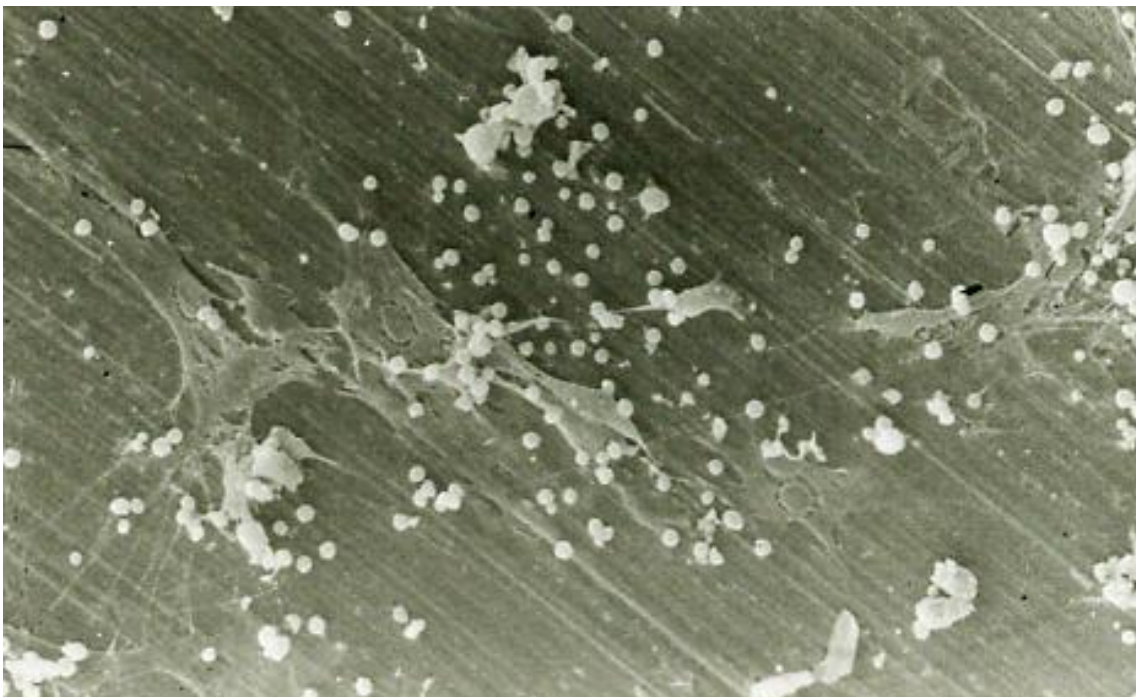
Das rasterelektronenmikroskopische Bild zeigte in diesem Fall zahlreiche, auf der Materialoberfläche adhärente Zellen rundlicher sowie länglicher Struktur, die sich überwiegend in Zellhaufen (Cluster) aber auch in vereinzelt auftretenden Formationen zeigten. Ferner waren vermutlich der ECM zuzurechnende fibrilläre Strukturen mit interzellulärem Kontakt erkennbar.



**Abb. 16:** REM-Aufnahme der Hydroxylapatitkeramik-Oberfläche nach zweiwöchigem Bewuchs mit humanen Knochenmarkszellen (400-fache Vergrößerung). Man erkennt flächenhaft ausgebreitete sowie abgerundete Zellen mit extrazellulären fibrillären Strukturen.

### 3.4.2 Reintitan

Hier zeigte sich im Vergleich zu den Keramiken eine geringere Zahl an adhärennten Zellen. Nach wie vor waren dabei rundliche und längliche, sowohl vereinzelt als auch in Cluster auftretende Zellformationen sowie fibrilläre Strukturen zu verzeichnen. Auch fand sich ein im Vergleich zur Hydroxylapatitkeramik insgesamt geringradiger ausgeprägter, jedoch noch geschlossener, adhärenter Zellrasen.

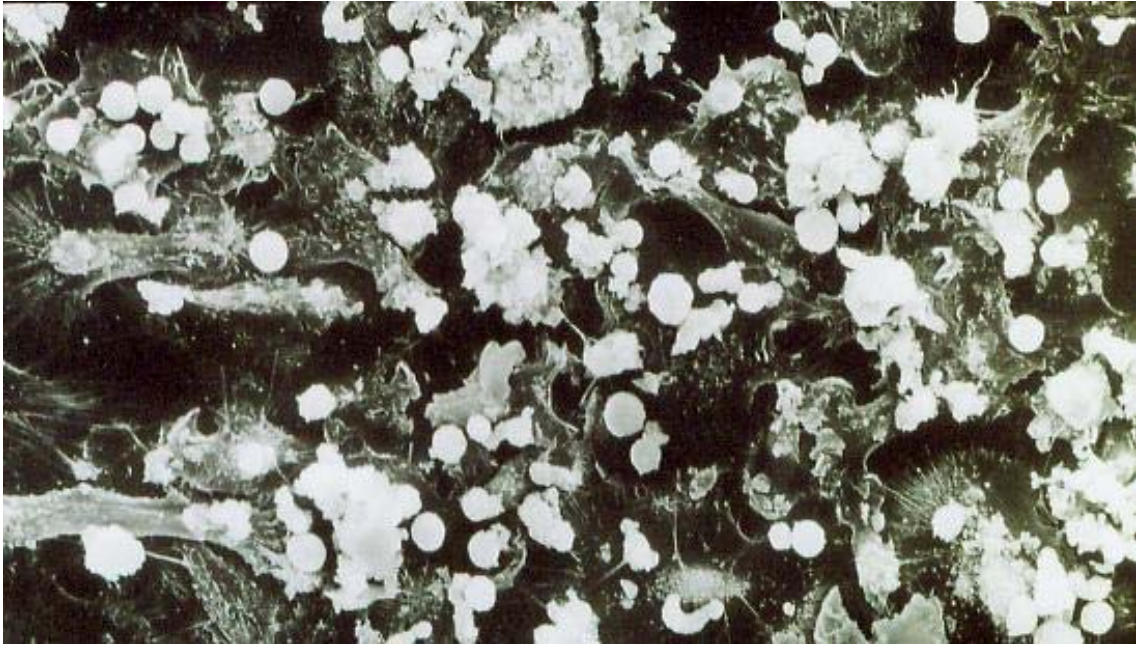


**Abb. 17:** REM-Aufnahme der Reintitan-Oberfläche nach vierzehntägiger Kultivierung (220-fache Vergrößerung). Es finden sich flach ausgebreitete und abgerundete Zellen mit interkonnektierendem Netzwerk.

### 3.4.3 Ti6Al7Nb-ODH (Tribosul)

Die Titanlegierung zeigte hinsichtlich ihres rasterelektronenmikroskopischen Erscheinungsbildes keine wesentlichen Unterschiede gegenüber dem Reintitan-Prüfkörper. Sowohl bezüglich der Zahl adhärenter Zellen als auch der Morphe zeigten die Zellen ein geringeres Ausprägungsbild als bei dem Hydroxylapatitprobenkörper.





**Abb. 18:** REM-Aufnahme eines Tribosul-Werkstoffes nach zweiwöchiger Kultivierung mit Knochenmarkszellen (400-fache Vergrößerung). Es zeigen sich ein dichter Zellrasen sowie Zell-zu-Zell-Kontakte und Clusterbildung .

#### 3.4.4 Polyäthylen

Bei dem Kunststoffpräparat zeigten sich nur noch vereinzelt auftretende, ausschließlich rundliche Zellen auf der Materialoberfläche, die nicht untereinander in Kontakt standen und auch keine Cluster-Bildung aufwiesen. Zeichen der Bildung extrazellulärer fibrillärer Strukturen, waren nicht zu sehen.

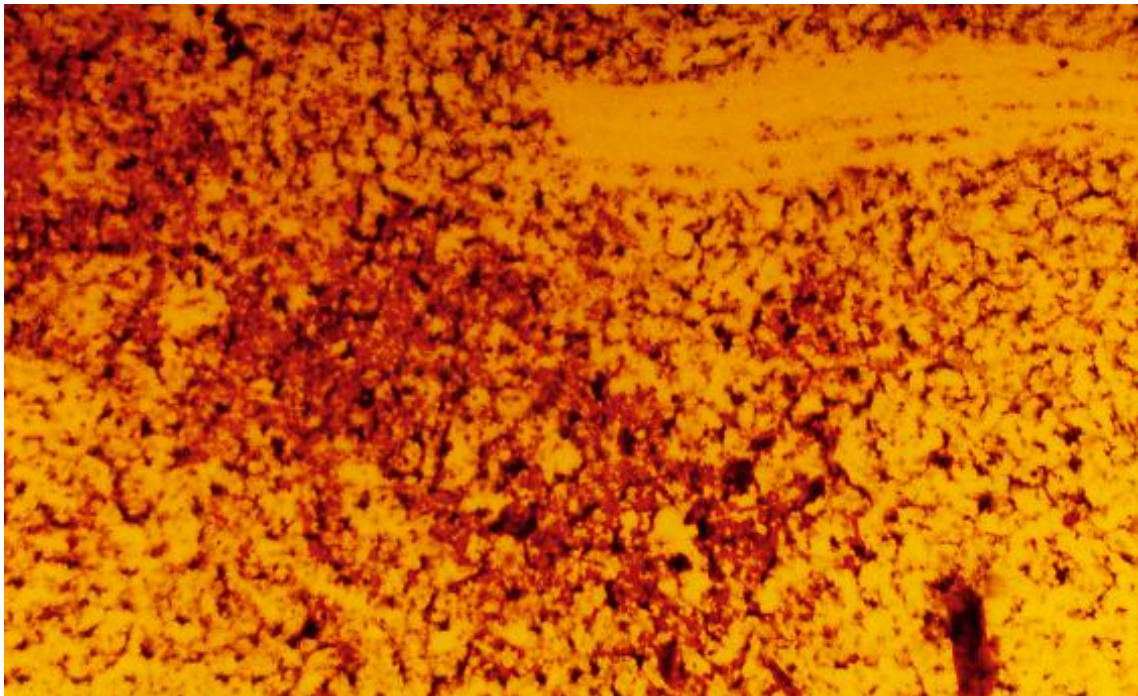


**Abb. 19:** REM-Aufnahme des Polyäthylen-Probenkörpers (76-fache Vergrößerung). Es sind nur vereinzelte Zellen und keine extrazellulären Strukturen sichtbar.

### 3.5 Langzeitkultivierung von humanen Knochenmarkszellen

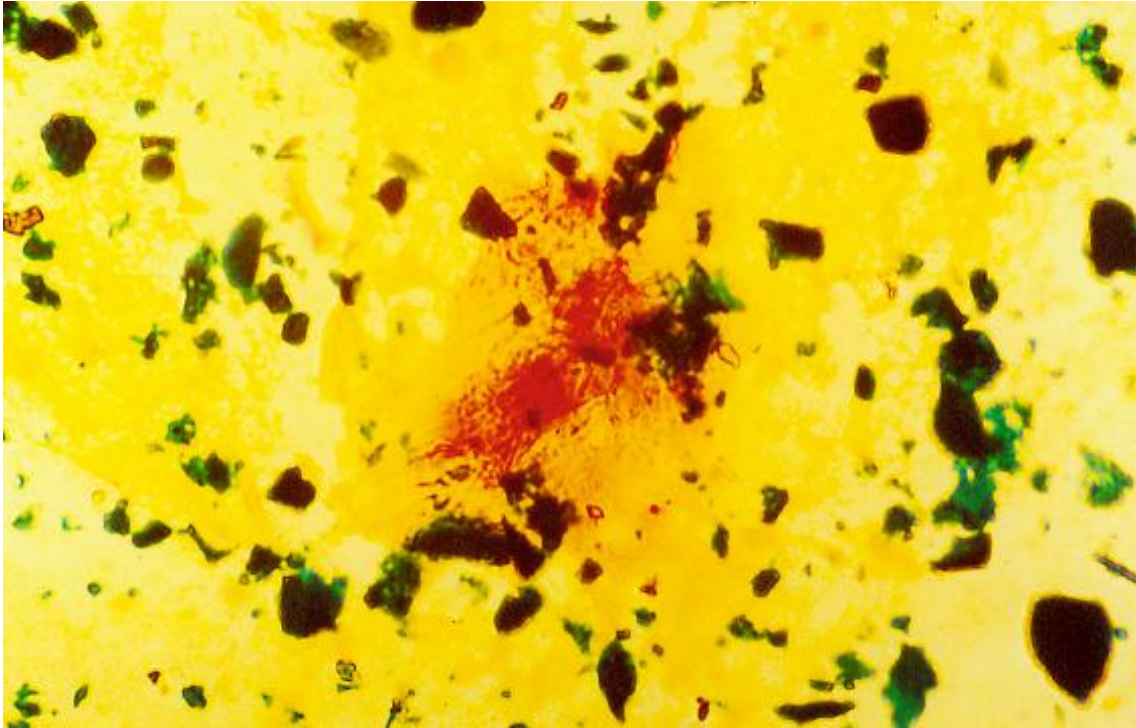
Um eine Möglichkeit zu erhalten, Wachstumsbestreben, Zelldifferenzierung und metabolisches Verhalten der kultivierten Knochenmarkszellen über den standardmäßigen Rahmen von 14 Tagen hinaus beurteilen zu können, wurde von den Probenkörpern sowie von Kontrollgruppen auf Deckgläschen eine Langzeitkultur von ca. 6-monatiger Dauer angelegt. Mittels Neu-Fuchsin-Färbung wurde ständig der Nachweis alkalischer Phosphatase erbracht. Jedoch gestaltete sich nach 80-tägiger Kulturdauer die Auswertung über die lichtmikroskopische Untersuchung der von Knochenmarkszellen bewachsenen Proben äußerst kompliziert, da aufgrund des mehrschichtig wachsenden Gewebes eine exakte Strukturanalyse nicht mehr möglich war. Zu diesem Zeitpunkt waren die Biomaterialien selbst nicht mehr die primären Prüfobjekte, sondern die Medienüberstände aus den dreitägigen Medienwechseln. Die gesammelten Überstände wurden bei 20° C eingefroren und schließlich mit der Dot-Blot Methode nach Anwesenheit von Alkalischer Phosphatase und Osteokalzin beziehungsweise von Kollagen I und III ausgetestet. In der angelegten Langzeitkultur auf gelatinisierten Deckgläschen, die als Kontrolle unter gleichbleibenden Bedingungen

weiterlief, konnten nach 186-tägiger Wachstumszeit unter Einhaltung der standardisierten Kulturbedingungen, eindeutig kalzifizierende Strukturen mittels von Kossa-Versilberung und Movat-Pentachrom Färbung gezeigt werden. So zeigte sich in der von-Kossa Versilberung eine gelb braune Färbung entsprechender Formationen, die als Nachweis calcifiziertem Gewebe anzusehen ist. Nach Anwendung der modifizierten Movat-Pentachrom-Färbung konnten leuchtend gelbe Anteile für Kollagen und blau-grün markierte Strukturen als Zeichen für mineralisierten Knochen gezeigt werden.



**Abb. 20:** Knochenmarkszellen auf Deckgläschen nach 6-monatiger Kultur mit durchgeführter von-Kossa Versilberung. Man erkennt neben gelb-braunen auch dunkelbraun gefärbte Strukturen, die als kalzifiziertes Gewebe zu bewerten sind (250-fache Vergr.).





**Abb. 21:** Knochenmarkszellen auf Deckgläschen nach 6-monatiger Kultivierung mit durchgeführter Movat Pentachrom-Färbung. Es zeigen sich blau-grün markierte Strukturen als Hinweis auf mineralisiertes Gewebe (250-fache Vergr.).

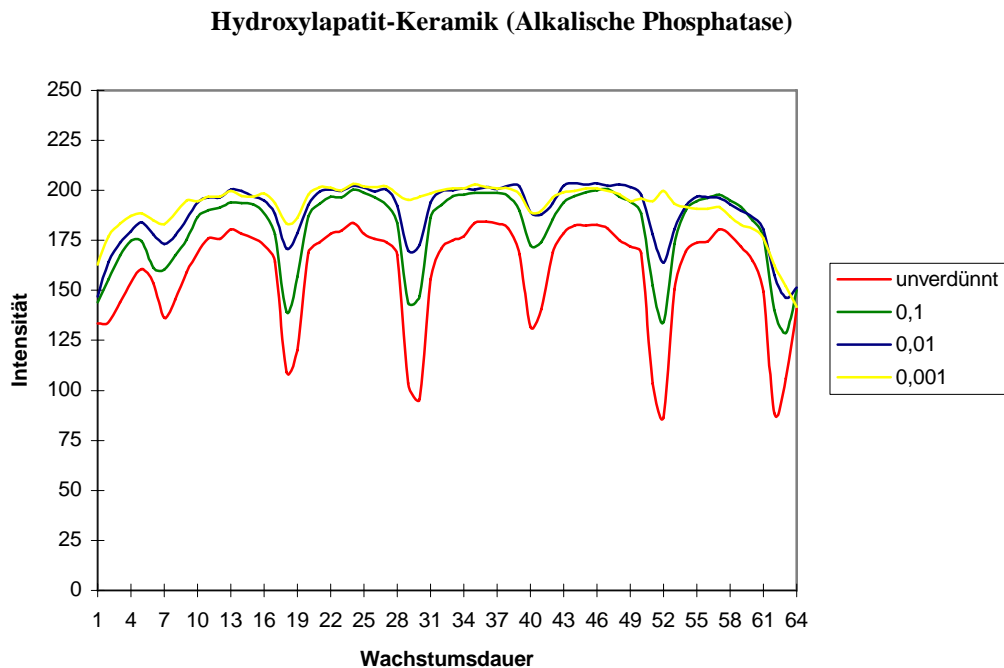
### 3.6 Dot-Blot

Zur qualitativen Ermittlung etwaiger materialbedingter Unterschiede in der Syntheserate extrazellulärer Matrix wurden Dot-Blots mit verschiedenen Antikörpern benutzt. Die bereits beschriebenen Divergenzen zwischen den einzelnen Materialgruppen in Bezug auf Zellzahl und Proliferationsbestreben zeigten sich auch in der Analyse der Dot-Blots durch unterschiedlich ausgeprägte Sekretion von Matrixproteinen in die Medienüberstände.

Ermittelt wurde die Konzentration der Matrixproteine Kollagen I und III, die an alkalischer Phosphatase sowie die des Proteins Osteokalzin als direktes Sekretionsprodukt des reifen Osteoblasten. Dabei zeigte sich auch hier eine hohe Konzentration von Kollagen I und III bei den Keramiken, wobei Kollagen I am meisten in das Medium exprimiert wurde, gefolgt von Konzentrationen bei den Metallen und zuletzt bei den Polymeren. Ähnlich verhielt es sich beim Nachweis von alkalischer Phosphatase.

Bei allen Materialien ließ sich der Gehalt an Osteokalzin in annähernd gleichen Konzentrationen nachweisen, jedoch waren in allen Fällen Sekretionsprodukte erst ab dem 48. Kulturtag zu verzeichnen.

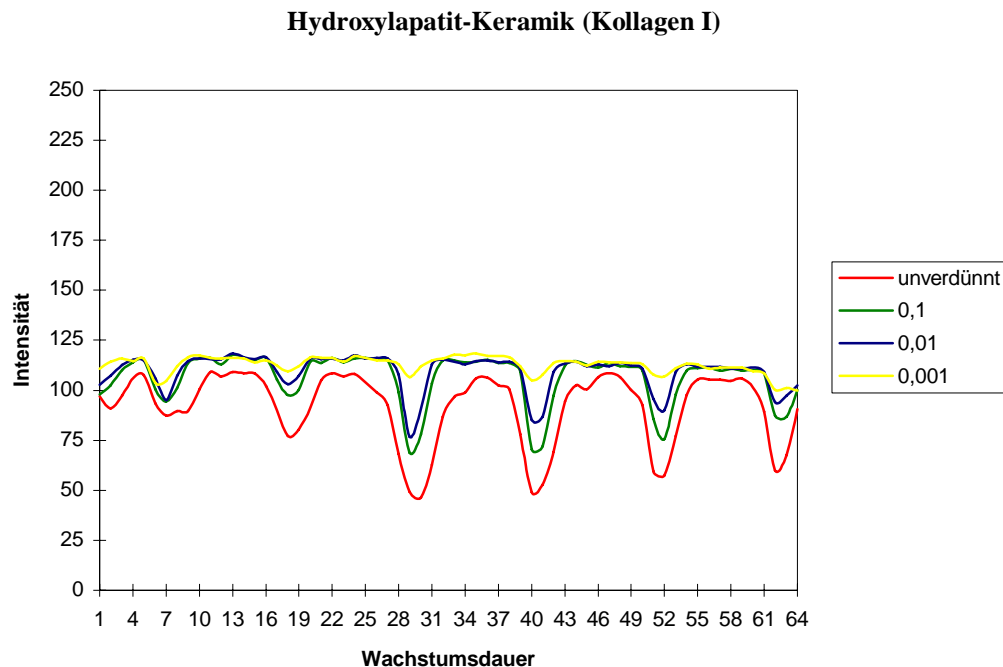
Die nachfolgenden Diagramme (1-12) zeigen den Substanznachweis in Form unterschiedlicher Grauwertintensitäten (0 = Folienfärbung, 250 = keine Folienfärbung) in Korrelation zur Kulturdauer. Zur Detektion der Grauwertintensitäten fährt ein Scanner die dots ab. An den Stellen, wo eine Grau- bzw. Schwarzfärbung vorliegt, zeigt der Kurvenverlauf einen Peak nach unten, welches einen positiven Nachweis des Proteins bedeutet. Zwischen den Peaks zeigen sich gerade Kurvenverläufe, welche Nulllinien bei gemessenen Leerdots entsprechen.



Kurvendiagramm einer Dot-Blot-Analyse von Alkalischer Phosphatase im Überstand von humanen Knochenmarkzellen auf Hydroxylapatitkeramik in einer Langzeitkultur.

Vorliegendes Kurvendiagramm gibt die Grauwertunterschiede einer Dot-Blot-Analyse auf Celluloseacetatfolie wieder. Zu diesem Zweck fährt ein Scanner die dots ab. An den dots, wo eine Grau- bzw. Schwarzfärbung vorliegt, zeigt der Kurvenverlauf einen Peak, wobei die Nulllinie im vorliegenden Diagramm bei 200 liegt und die positiven Ausschläge von der Nulllinie nach unten zeigen. Nach jedem Proben-dot geht der Kurvenverlauf auf die Nulllinie zurück, da der Scanner einen Leerdot mißt. Bei dem gezeigten Kurvenverlauf wurden Mediumüberstände unterschiedlicher Verdünnungen

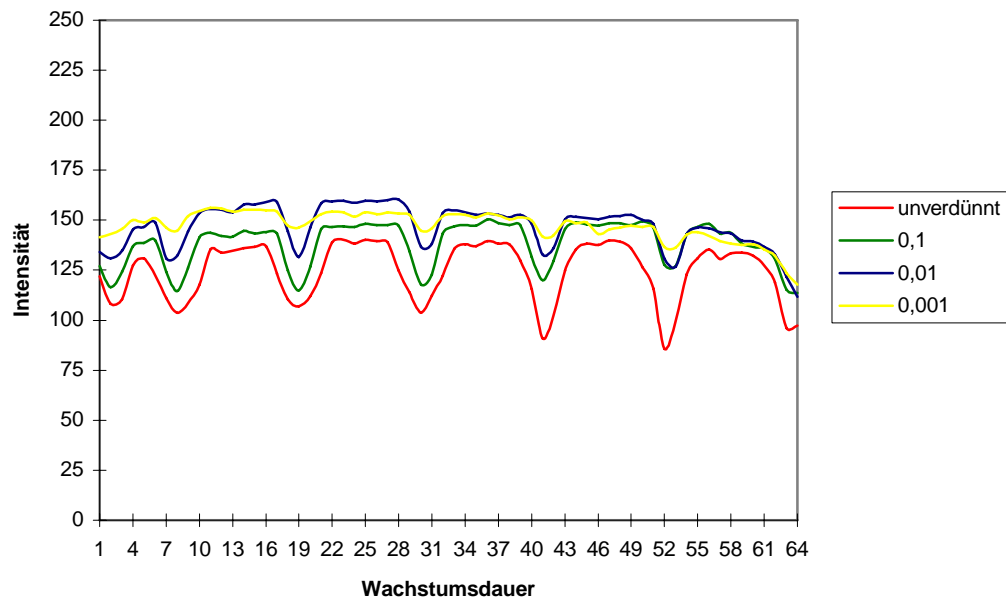
nach einer Kulturdauer von 2, 9, 18, 30, 41, 52 und 64 Tagen gemessen. Es zeigt sich eine zunehmende Sekretion an alkalischer Phosphatase bis zum 30. Kulturtag, eine Abnahme am 40. Kulturtag und eine gesteigerte, gleichbleibende Sekretion ab dem 52. Kulturtag.



Kurvendiagramm einer Dot-Blot-Analyse von Kollagen I im Überstand von humanen Knochenmarkzellen auf Hydroxylapatitkeramik in einer Langzeitkultur.

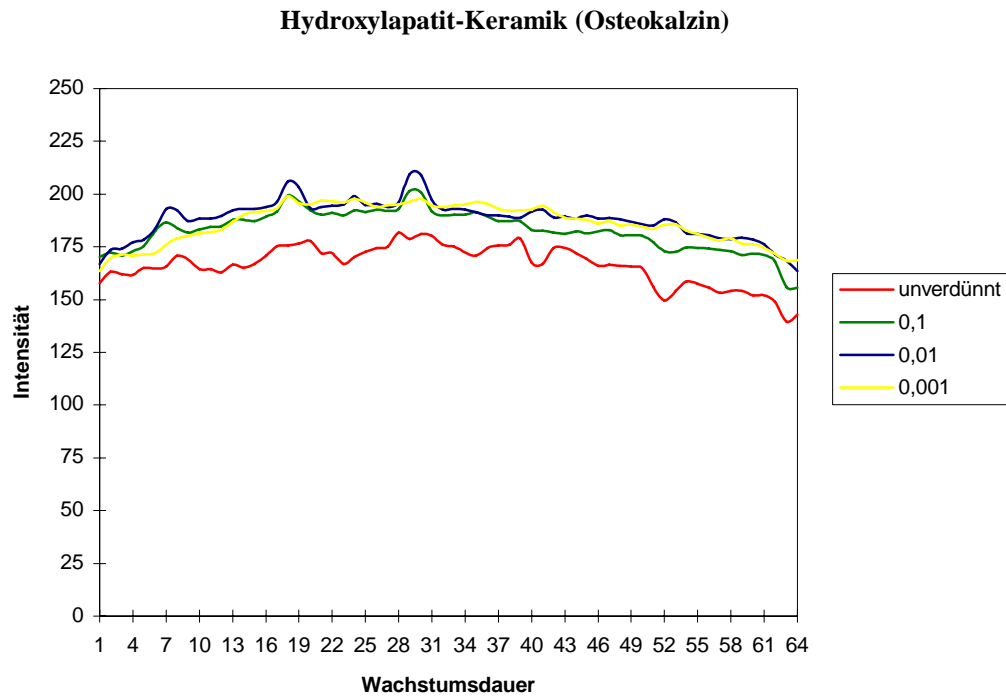
Bei dem gezeigten Kurvenverlauf wurden Mediumüberstände unterschiedlicher Verdünnungen nach einer Kulturdauer von 2, 9, 18, 30, 41, 52 und 64 Tagen gemessen. Es zeigt sich eine zunehmende Sekretion an Kollagen I bis zum 30. Kulturtag gefolgt von einem geringradigen Sekretionsrückgang bis zum 64. Kulturtag.

### Hydroxylapatit-Keramik (Kollagen III)



Kurvendiagramm einer Dot-Blot-Analyse von Kollagen III im Überstand von humanen Knochenmarkzellen auf Hydroxylapatitkeramik in einer Langzeitkultur.

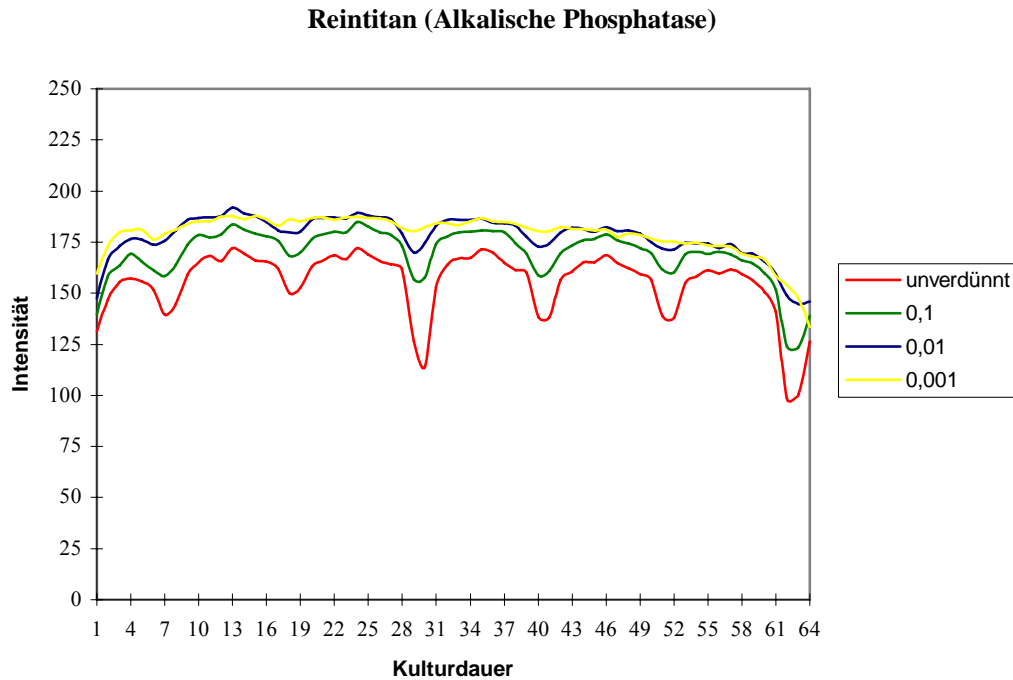
Bei dem gezeigten Kurvenverlauf wurden Mediumüberstände unterschiedlicher Verdünnungen nach einer Kulturdauer von 2, 9, 18, 30, 41, 52 und 64 Tagen gemessen. Es zeigt sich eine zunehmende Sekretion an Kollagen III bis zum 41. Kulturtag, gefolgt von einem Sekretionsrückgang nach dem 52. Kulturtag.



Kurvendiagramm einer Dot-Blot-Analyse von Osteokalzin im Überstand von humanen Knochenmarkzellen auf Hydroxylapatitkeramik in einer Langzeitkultur.

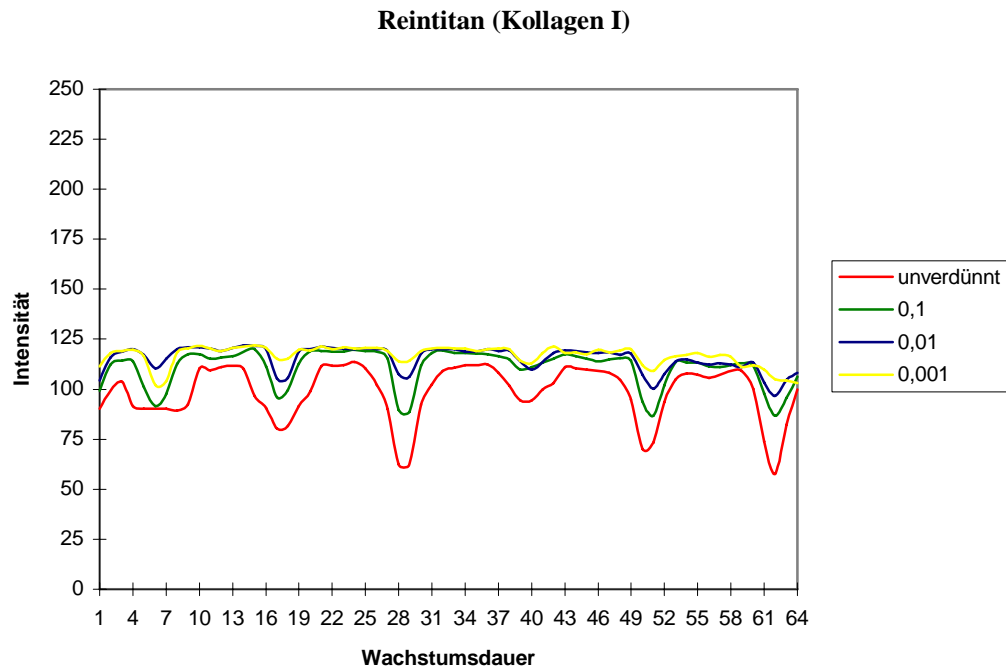
Bei dem gezeigten Kurvenverlauf wurden Mediumüberstände unterschiedlicher Verdünnungen nach einer Kulturdauer von 2, 9, 18, 30, 41, 52 und 64 Tagen gemessen. Es ließ sich eine Sekretion von Osteokalzin ab dem 41. Kulturtag nachweisen.





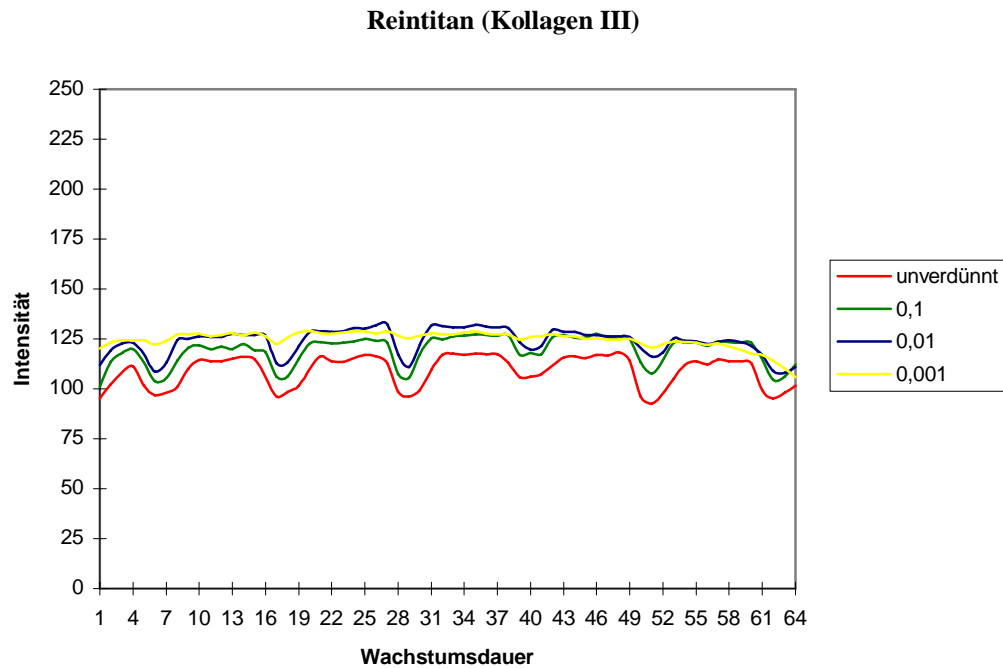
Kurvendiagramm einer Dot-Blot-Analyse von Alkalischer Phosphatase im Überstand von humanen Knochenmarkzellen auf Reintitan in einer Langzeitkultur.

Bei dem gezeigten Kurvenverlauf wurden Mediumüberstände unterschiedlicher Verdünnungen nach einer Kulturdauer von 2, 9, 18, 30, 41, 52 und 64 Tagen gemessen. Es zeigt sich eine initiale Sekretion mit Abnahme am 18. Kulturtag, einem Peak am 30. Tag, gefolgt von einem Sekretionsrückgang am 41. und 52. Tag mit anschließender Sekretionszunahme ab dem 64. Tag.



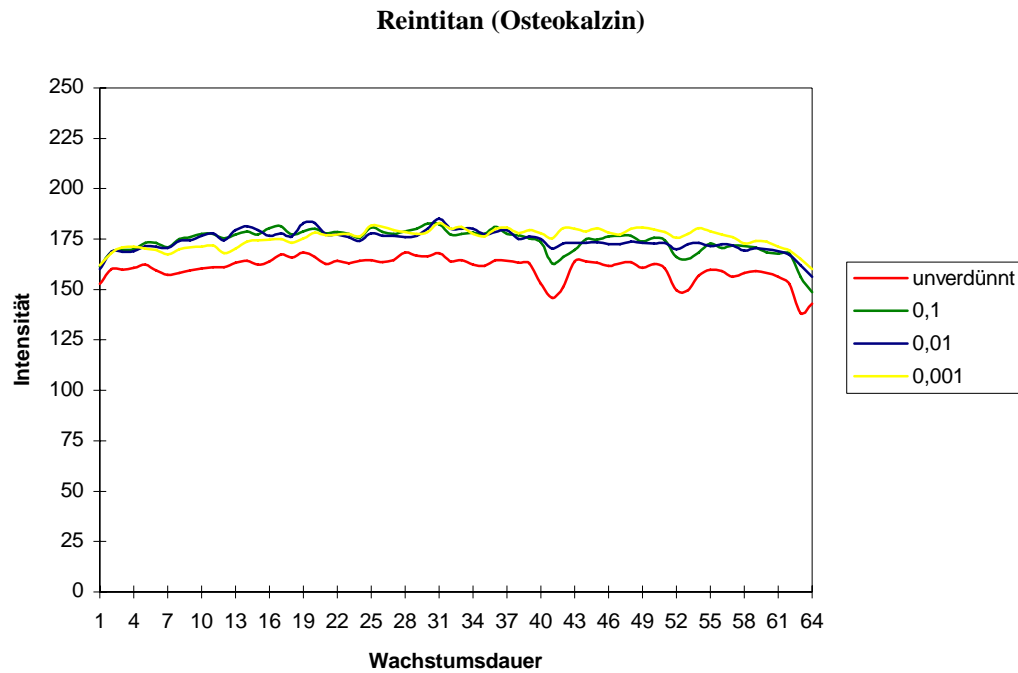
Kurvendiagramm einer Dot-Blot-Analyse von Kollagen I im Überstand von humanen Knochenmarkzellen auf Reintitan in einer Langzeitkultur.

Bei dem gezeigten Kurvenverlauf wurden Mediumüberstände unterschiedlicher Verdünnungen nach einer Kulturdauer von 2, 9, 18, 30, 41, 52 und 64 Tagen gemessen. Es zeigt sich eine zunehmende Sekretion an Kollagen I bis zum 28. Kulturtag gefolgt von einer Abnahme am 41. Tag und konsekutiver Zunahme ab dem 52. Tag.



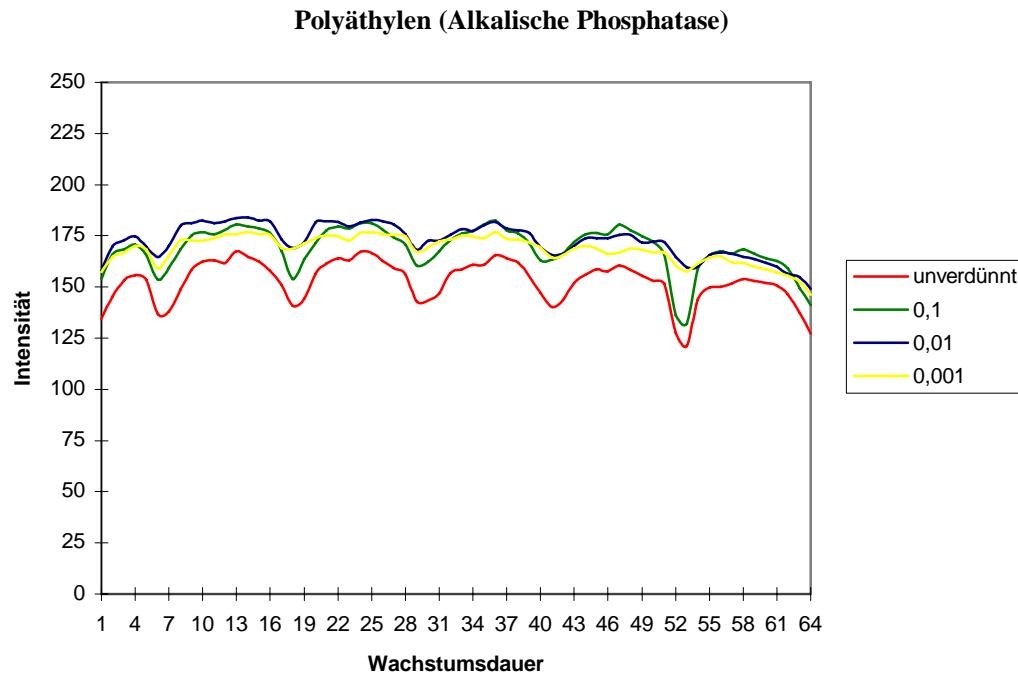
Kurvendiagramm einer Dot-Blot-Analyse von Kollagen III im Überstand von humanen Knochenmarkzellen auf Reintitan in einer Langzeitkultur.

Bei dem gezeigten Kurvenverlauf wurden Mediumüberstände unterschiedlicher Verdünnungen nach einer Kulturdauer von 2, 9, 18, 30, 41, 52 und 64 Tagen gemessen. Es zeigt sich eine Sekretion an Kollagen III bis zum 28. Kulturtag gefolgt von einem Sekretionsrückgang um den 41. Tag und erneuter Zunahme ab dem 52. Tag.



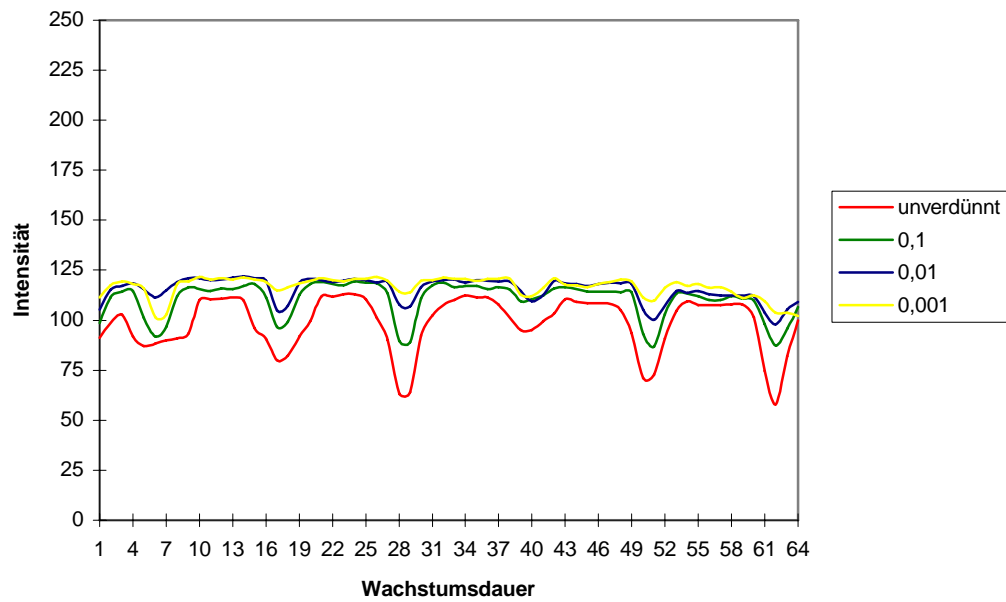
Kurvendiagramm einer Dot-Blot-Analyse von Osteokalzin im Überstand von humanen Knochenmarkzellen auf Reintitan in einer Langzeitkultur.

Bei dem gezeigten Kurvenverlauf wurden Mediumüberstände unterschiedlicher Verdünnungen nach einer Kulturdauer von 2, 9, 18, 30, 41, 52 und 64 Tagen gemessen. Es ließ sich eine Sekretion von Osteokalzin ab dem 40. Kulturtag nachweisen.



Kurvendiagramm einer Dot-Blot-Analyse von Alkalischer Phosphatase im Überstand von humanen Knochenmarkzellen auf Polyäthylen in einer Langzeitkultur. Bei dem gezeigten Kurvenverlauf wurden Mediumüberstände unterschiedlicher Verdünnungen nach einer Kulturdauer von 2, 9, 18, 30, 41, 52 und 64 Tagen gemessen. Eine deutliche Sekretion zeigt sich erst ab dem 52. Kulturtag.

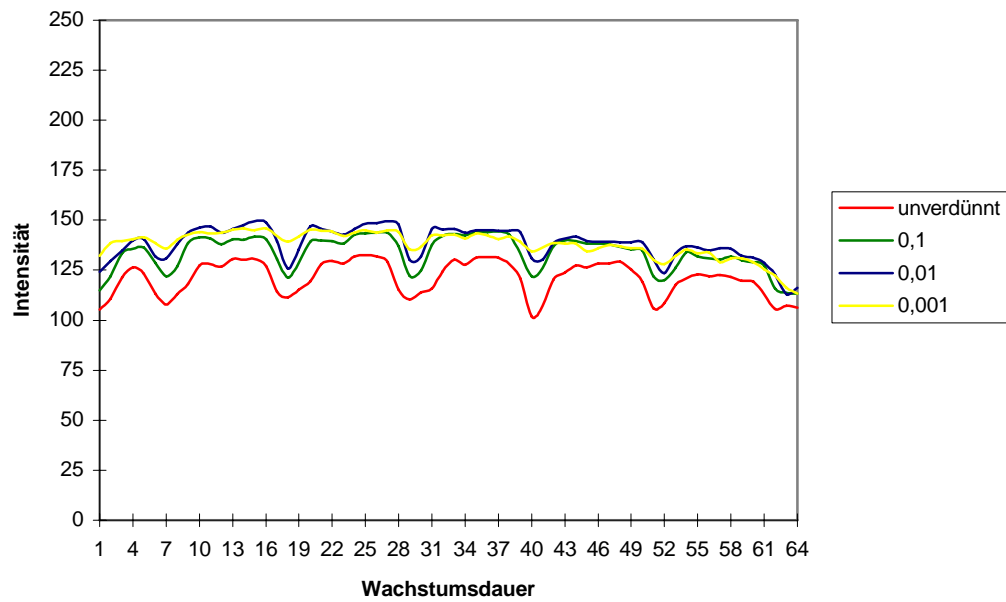
**Polyäthylen (Kollagen I)**



Kurvendiagramm einer Dot-Blot-Analyse von Kollagen I im Überstand von humanen Knochenmarkzellen auf Polyäthylen in einer Langzeitkultur.

Bei dem gezeigten Kurvenverlauf wurden Mediumüberstände unterschiedlicher Verdünnungen nach einer Kulturdauer von 2, 9, 18, 30, 41, 52 und 64 Tagen gemessen. Bis zum 30. Tag zeigt sich eine zunehmende Sekretion, mit Rückgang am 38. Tag und steigender Sekretion ab dem 52. Tag.

**Polyäthylen (Kollagen III)**

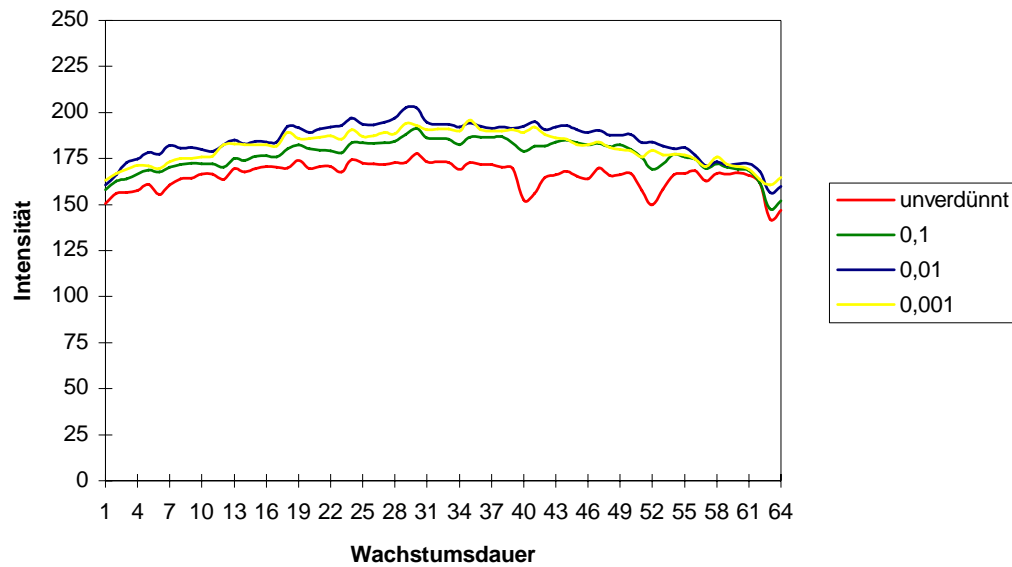


Kurvendiagramm einer Dot-Blot-Analyse von Kollagen III im Überstand von humanen Knochenmarkzellen auf Polyäthylen in einer Langzeitkultur.

Bei dem gezeigten Kurvenverlauf wurden Mediumüberstände unterschiedlicher Verdünnungen nach einer Kulturdauer von 2, 9,18,30,41,52 und 64 Tagen gemessen. Eine deutliche Sekretion zeigt sich erst ab dem 52. Kulturtag.

Bis zum 30. Tag zeigt sich eine anhaltende Konzentration, ein Peak am 41. Tag mit konsekutivem Sekretionsrückgang.

### Polyäthylen (Osteokalzin)



Kurvendiagramm einer Dot-Blot-Analyse von Osteokalzin im Überstand von humanen Knochenmarkzellen auf Polyäthylen in einer Langzeitkultur.

Bei dem gezeigten Kurvenverlauf wurden Mediumüberstände unterschiedlicher Verdünnungen nach einer Kulturdauer von 2, 9, 18, 30, 41, 52 und 64 Tagen gemessen. Es zeigte sich eine geringradige Sekretion ab dem 41. Kulturtag.



#### 4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Biomaterialien auf ihre Biokompatibilität hin zu überprüfen. Besondere Berücksichtigung fand dabei die Titanlegierung Tribosul, die aufgrund veränderter Oberflächenbeschaffenheit vorteilhafte Voraussetzungen gegenüber den bisherigen Biomaterialien in Hinblick auf tribologische Eigenschaften aufwies.

Wie bereits in der Einleitung angedeutet, bestehen trotz Bemühungen internationaler Forschungsgruppen um Qualitätssicherung noch keine allgemeingültigen Richtlinien, die Art und Umfang der Kompatibilitätstestung vorgeben. Als erstrebenswert gilt es, medizinische Werkstoffe zu entwickeln, die aufgrund gewebeverträglicher Eigenschaften des Implantates ein problemloses Einheilen ermöglichen (Hench et al., 1975). Dabei ist der Interaktion zwischen Implantatoberfläche und dem Wirtsgewebe auf zellulärer und molekularer Ebenen eine entscheidende Bedeutung beizumessen.

Folkman und Maroudas beschrieben die Aspekte, die von immenser Bedeutung beim Kontakt von Biomaterialien mit den Zellen des Wirtsgewebe sind, als das Bestreben der Zellen nach Adhärenz, Wachstum, Proliferation und Differenzierung zum einen sowie Wachstumshemmung, Dedifferenzierung und Tod der Zellen zum anderen (Folkman et al., 1978; Maroudas, 1973).

Zu diesen Wechselwirkungen benötigt die Osteogenese zur suffizienten Bildung von Knochengewebe Materialoberflächen, welche der Zellproliferation und der Bildung von extrazellulärer Matrix förderlich sind. Materialien mit einer zytotoxischen Wirkung erweisen sich hierbei als störend (Weiss et al., 1981; Stutzmann et al., 1982).

Aufbauend auf die Vorgehensweise früherer Forschungsgruppen (Guess et al., 1965; Mital et al., 1968; Taylor et al., 1973; Ratner et al., 1975; Jones et al., 1988; Kubo et al., 1993) wollten wir mit Hilfe einer humanen Knochenmarkszellkultur die unterschiedlichen Parameter, die die eigentliche Biokompatibilität ausmachen, in einem phänomenologischen Procedere näher zu beleuchten, bei dem quantitative, qualitative, morphologische und metabolische Aspekte Eingang in die Untersuchungen fanden. Der spezielle Vorteil, den hierbei die humane Knochenmarkszellkultur bietet, wird deutlich, wenn man sich im Vergleich dazu andere Methoden der in-vitro-Testung vor Augen führt.

#### 4.1 Die humane Knochenmarkszellkultur zur Biokompatibilitätstestung

Die humane Knochenmarkszellkultur verbindet als Flüssigmediumzellkultur die Vorteile der "Direktkontaktmethode", die die Implantationssituation orthopädisch verwandter Implantationsmaterialien am besten simuliert, mit der Verwendung humaner Knochenmarkszellen, welche in situ primär mit dem Endoprothesematerial in Kontakt stehen (Wilke et al., 1998). Ferner bieten humane Knochenmarkszellen weitere Vorteile: Sie enthalten neben immunkompetenten Zellen auch Progenitorzellen, undifferenzierte mesenchymale Stammzellen, welche durch ihre Fähigkeit, sich nach Kontakt mit einem Biomaterial unterschiedlich differenzieren zu können (etwa in Richtung Osteoblast oder Fibroblast), eine Prognose über die vorraussichtlich stattfindende lokale Gewebsreaktion gestatten (Wilke et al., 1992). Zusätzlich gelang es, eine Langzeitkultur mit humanen Knochenmarkszellen zu etablieren, die die Möglichkeit bietet auch langfristig ablaufende Wechselwirkungen zwischen Gewebe und Implantat zu beurteilen.

In mehreren Studien konnten zum Teil sehr unterschiedliche Sensitivitäten verschiedener Zellarten auf gleiche Materialien nachgewiesen werden (Nuwayser et al, 1973; Browne und Tyas, 1979; Lang et al, 1989; Naji und Harmand, 1990; Caughman et al, 1990; Harmand et al, 1990; Puleo et al, 1991; Jansen et al, 1991; Berstein et al, 1992; Niederauer et al, 1994). So zeigten zum Beispiel humane Osteoblasten in der Studie von Lang (Lang et al, 1989) eine deutlich höhere Sensitivität bei der Testung von Hydroxylapatit als die ebenfalls verwendeten humanen Fibroblasten. In der Arbeit von Harmand (Harmand et al, 1990) zeigten humane HeLa-Zellen ein vermindertes Zellwachstum im direkten Kontakt mit einem Epoxidharz, während mit der gleichen Versuchsanordnung bei Mäuseembryonenzellen sogar ein gesteigertes Zellwachstum zu beobachten war. Angesichts dieser unterschiedlichen Reaktionen der Zellen stellt sich die Frage nach der Aussagefähigkeit der gefundenen Ergebnisse.

So kann es nicht verwundern, daß zwischen Studien, die mit verschiedenen Zellen arbeiten, zum Teil erhebliche Differenzen in den Bewertungen der Materialien entstehen. Genaugenommen kann eigentlich nur festgestellt werden, daß die jeweilig verwendete Zellart auf eine getestete Substanz in einer bestimmten Art und Weise reagiert. Diese spezifische Reaktion der kultivierten Zellen auf die klinische Situation bei menschlichem Kontakt

mit dem Material zu übertragen, erscheint daher nicht so ohne weiteres zulässig (Evans und Thomas, 1986). Besonders die Verwendung tierischer Zellen und von Zellen, die normalerweise nicht mit dem Biomaterial in Berührung kommen, ist fragwürdig (Wilke et al, 1991a, Wilke et al, 1991).

Um die Aussagekraft der mit Zellkulturen gewonnenen Ergebnisse zu verbessern, wurde daher die Forderung gestellt, humane Zellen zu verwenden, die auch in situ in Kontakt mit dem jeweiligen Biomaterial stehen (Pizzoferrato et al, 1985; Kamen, 1989; Harmand et al, 1990). Arbeiten, die in jüngerer Zeit zur Testung orthopädischer Materialien mit humanen Knochenmarkzellen durchgeführt wurden, zeigten sowohl mit dem Tierversuch als auch mit der klinischen Situation eine sehr gute Übereinstimmung. Diese sehr komplexen Zellkulturen sind in der Lage, die physiologischen Gegebenheiten des Implantatbettes in nahezu idealer Weise zu modellieren (Wilke et al, 1993a; Wilke et al, 1993b).

Wie einleitend bereits erwähnt, wurden seit Entstehen der in vitro-Biokompatibilitätstestung neben der Vielzahl verwendeter Zellen auch unterschiedliche Testmethoden (z.B. Direkt Kontakt, Agar Overlay, Extraktionsmethode, Millipore Filter Methode) etabliert. Es hat sich gezeigt, daß die verschiedenen Methoden zum Teil sehr unterschiedliche Bewertungen identischer Materialien ergaben (Wilsnack et al, 1973; Hensten-Pettersen und Helgeland, 1977; Johnson et al, 1983; Welker et al, 1983; Haustveit et al, 1984). So zeigten zum Beispiel PVC-Materialien, die mit der Extraktionsmethode in der Studie von Wilsnack (Wilsnack et al, 1973) untersucht wurden, eine deutliche Toxizität auf humane fetale Fibroblasten, wohingegen die gleichen Materialien im direkten Kontakt nicht toxisch waren.

Die Toxizitätsprüfung mit Hilfe der Agar Overlay Methode, der Millipore Filtermethode, sowie der Direkt Kontakt Methode werden in ähnlicher Weise von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Auch hier spielt zum Beispiel die Dauer der Testung, die Form des Prüfmaterials sowie die Wahl des Mediums eine große Rolle.

Neben der Art der Testmethode hat auch die Auswahl der Nachweismethode einen Einfluß auf die gewonnenen Ergebnisse. In mehreren Arbeiten wurden erhebliche Unterschiede zwischen der Bewertung der Toxizität durch rein morphologische Zelluntersuchungen im Vergleich zu der Quantifizierung der Toxizität durch metabolische Parameter beschrieben (Exbrayat et al, 1987; Caughman et al, 1991; Puleo und Bizias, 1992; Lefebvre und Schuster, 1994).

In zahlreichen Studien zeigte sich auch ein erheblicher Einfluß der Oberflächenbehandlung des Prüfmaterials auf das Verhalten von Zellen im direkten Kontakt.

Biomaterialien, die in einer glatten, polierten Form getestet wurden, erbrachten zumeist deutlich bessere Zellverträglichkeit als identische mit rauher Oberfläche (Inoue et al, 1987; Absolom et al, 1988; Naji und Harmand, 1990; Kasten et al, 1990; Novak et al, 1991; Koekoenen et al, 1992; Begley et al, 1993; Howlett et al, 1994).

An PVC wurde zum Beispiel nachgewiesen, daß durch den unterschiedlichen Gehalt an Stabilisatoren und Weichmachern in den verschiedenen Produkten ein erheblicher Einfluß auf die Toxizität des Materials ausgeübt wurde (Goertz et al, 1974; Wieslander et al, 1990).

Auch der Vergleich der Untersuchungen von Metallegierungen ist wegen der wechselnden Legierungsbestandteilen nur eingeschränkt möglich (Klötzer, 1988).

Abschließend kann festgestellt werden, daß eine Vielzahl verschiedenster Parameter die Resultate der Arbeiten beeinflussen, und eine Vergleichbarkeit der Arbeiten untereinander sehr erschweren. Richtlinien für die Art der Zellen, die Form der Materialien sowie für die Methoden zur Biokompatibilitätstestung wurden zwar von mehreren Organisationen (ASTM American Society for Testing and Materials, FDA Food and Drug Administration, ISO International Organization for Standardization, BSI British Standards Institute, USP United States Pharmacopeia) vorgeschlagen, bis heute jedoch bestehen keine definitiven Regularien (Ciapetti et al, 1993; Sasanaluckit et al, 1993).

Keine der bekannten Testverfahren und Nachweismethoden ist gleichermaßen für alle Materialien anwendbar (Evans und Thomas, 1986). Jede der Methoden hat ihre speziellen Vorzüge, aber auch Einschränkungen, die bei der Indikationsstellung genau berücksichtigt werden müssen.

Der Begriff der Biokompatibilität umfaßt die Forderung an ein Material nicht toxisch zu sein, keine mutagenen Wirkungen zu entwickeln, nicht sensibilisierend zu wirken, sowie attraktiv und adhäsiv für Zellen zu sein (Kawahara, 1985).

Im Hinblick auf diese Vorgaben ist es zum Beispiel nicht möglich, die Biokompatibilität eines Materials allein durch Anwendung der Extraktionsmethode zu bewerten. Da mit der Extraktionsmethode die Adhäsionsfähigkeit der Zellen an das Material nicht zu untersuchen ist, kann mit dieser Methode nur eine Aussage über die Toxizität eines

Materials getroffen werden, jedoch gemäß der Definition nicht über die Biokompatibilität.

Für die häufig verwendete Agar Overlay Methode gelten im Prinzip die gleichen Einschränkungen. Es wurde zudem mehrfach kritisiert, daß großvolumige Moleküle von der Agarschicht abgefiltert werden und das Ergebnis somit verfälscht wird (Ekwall, 1980; Doherty, 1991; Lefebvre und Schuster, 1994). Auch ist es mit der Agar Overlay Methode nur möglich, die Zellyse zu beobachten, ohne jedoch eine Aussage über die Produktion von Extrazellulärmatrix oder eventuelle intrazelluläre Schädigungen zu treffen (Doherty, 1991).

Die Direkt Kontakt Methode bietet die Möglichkeit, die Reaktion einer bestimmten Zellart im unmittelbaren Kontakt mit dem Material zu untersuchen. Gerade bei der Schritt für Schritt Untersuchung der Interfacebildung zwischen Biomaterial und Zelle ist dies ein entscheidender Vorteil (Matsuda et al, 1987a; Davies, 1986; Gregoire et al, 1990; Puleo und Bizios, 1992). Der direkte Kontakt der Zellen mit dem Material stellt zudem die physiologischste Form der Materialprüfung dar. Unter Verwendung relevanter Zellen, wie zum Beispiel den humanen Knochenmarkszellen für die Biokompatibilitätstestung orthopädischer Implantatmaterialien, sowie durch geeignete Nachweisverfahren, läßt sich eine gute Einschätzung der Materialverträglichkeit treffen (Wilke et al, 1994).

Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit, unterschiedliche Oberflächenqualitäten unter definierten Bedingungen zu untersuchen (Kamen, 1989).

## **4.2 Bewertung der Ergebnisse**

### **4.2.1 Test der Zellvitalität durch Acridin-Orange Färbung**

Die mittels Acridin-Orange nachgewiesene Vitalität der humanen Knochenmarkszellen hat verdeutlicht, daß unter Anwendung beschriebener Präparationsmethodik und Beachtung entsprechender Kulturbedingungen eine prinzipielle Kultivierung solcher Zellen auf Testmaterialien möglich ist und somit die Grundlage für weitergehende Untersuchungen geschaffen wird. Ferner deutete bereits hier eine unterschiedliche Anzahl vitaler Zellen auf den verschiedenen Biomaterialien (die wenigsten avitalen Zellen befanden sich auf den Keramiken, die meisten auf den Polymeren) auf einen

materialbedingten Einfluß der Werkstoffe auf die Zellzahl hin, ein Phänomen, das sich in weiteren Untersuchungen bestätigen sollte.

So ergab die Zellzählung nach Hämatoxylin Färbung (Mittelwerte aus 10 Experimenten) mit Hilfe des OPTIMAS-Systems signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Werkstoffgruppen, wobei Vertreter der Polymere den geringsten, Vertreter der Keramiken die größte gemittelte Zellzahl auf den Materialoberflächen aufwies.

Die Betrachtung der kultivierten Zellen auf den Oberflächen der Prüfkörper mittels Rasterelektronenmikroskopie ließ Unterschiede zwischen den einzelnen Materialien erkennen. Dies zeigte sich in Form von adhärenenten Zellen unterschiedlicher Gestalt sowie fibrillären Strukturen mit interzellulärem Kontaktbestreben, welche in größter Zahl auf den Keramikprobenkörpern, gefolgt von Metallen und Polymeren, wobei es sich hierbei morphologisch betrachtet am ehesten um extrazelluläre Matrix handelte, nachzuweisen war.

#### **4.2.2. Immunhistologischer Nachweis leukozytärer und osteoblastärer Strukturen auf den Materialoberflächen durch Auflichtmikroskopie**

Diese Technik gab erste Anhaltspunkte auf den Gehalt und die Verteilung von immunkompetenten Zellen sowie Osteoblasten als ein Hinweis auf abgelaufene Gewebereaktionen bzw. Produktion und Mineralisation der ECM (Burkhardt et al. 1992). Der größte Anteil Osteokalzin-positiver Zellen befand sich auf den Keramiken, gefolgt von Metallen und Polymeren. Hinsichtlich der Verteilung immunkompetenter Zellen zeichnete sich der Polymerprobenkörper durch einen hohen Gehalt an Zellen der weißen Reihe aus, was als ein Hinweis auf verminderte Bioverträglichkeit gedeutet werden kann, wie im folgenden näher beschrieben werden wird.

Als ein Nachteil der eben beschriebenen Methode ist die hohe Eigenfluoreszenz der Zellen zu bewerten, die nur eine eingeschränkte Beurteilung zuläßt und lediglich tendenzielle Entwicklungen widerspiegeln kann. Als ein Nachteil aller vier bis jetzt beschriebenen Methoden ist ihr stark qualitativer, eher deskriptiver Charakter anzusehen. Aus diesem Grund bedienten wir uns auch Untersuchungsverfahren, die es durch Erfassung objektivierbarer Parameter, wie z.B. Syntheseprodukte oder Antigen-Antikörperreaktionen ermöglichten, tendenzielle Entwicklungen in signifikante, quantifizierbare Größen zu transferieren.

#### **4.2.3 Durchflußzytometrie mittels FACS (Fluorescence Analysis Cell Sorter)**

Vitalität:

Grundlage für die Differenzierung der humanen Knochenmarkszellen auf den Biomaterialien stellt zunächst einmal deren Vitalität dar. In der quantitativen Zellzählung der avitalen Zellen nach Zugabe von Propidiumjodid mittels Cell Sorter zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Keramiken (8,1% avitale Zellen) und den Polymeren (15,4% avitale Zellen). Die beiden Titanlegierungen zeigten weder untereinander noch gegenüber der Keramik einen signifikanten Unterschied.

Zelldifferenzierung:

Da sich Knochenmark im physiologischen Zustand durch Zellheterogenität auszeichnet galt es, nicht nur der alleinigen Anwesenheit von vitalen Zellen Aufmerksamkeit zu schenken. Auch ihre Differenzierung und Funktion im Rahmen von Reaktionen auf toxische und körperfremde Substanzen im Rahmen der Knochenneubildung und -formation wurde untersucht.

Die Zellen der weißen Reihe haben eine tragende Rolle bei der Immunantwort des menschlichen Organismus auf eindringende Fremdkörper. Ihr Differenzierungsverhalten beim Kontakt humaner Knochenmarkszellen mit endoprothetischem Biomaterial konnte im Zellkulturmodell näher beleuchtet werden.

Bei der Verteilung immunkompetenter Zellen zeigten sich auf allen Materialien annähernd gleiche Zellzahlverhältnisse von Monozyten und T-Lymphozyten. Bei den Polymeren bestanden in Hinblick auf Granulozyten und B-Lymphozyten deutliche Unterschiede zu den Keramiken und zu den Titanlegierungen. Diese vermehrte Verteilung von Phagozytosezellen und B-Lymphozyten auf den Kunststoff-Probenkörpern, restriktive Polyäthylen-Materialien, läßt Reaktionen vermuten, die der Einbindung des Biomaterials in seine knöcherne Umgebung entgegenwirken. Möglicherweise finden sich hier Erklärungsansätze für die in klinischen und tierexperimentellen Versuchen beobachtete "Polyethylene disease" (Griss et al. 1993), bei der nach direktem Kontakt von Knochenmarkszellen mit Polyäthylenpartikeln ein starker Anstieg von Phagozytosezellen als Ausdruck einer massiven Fremdkörperreaktion (aggressive Granulome) (Antony et al., 1990; Escola et al., 1990; Santavirta et

al., 1990) mit nachfolgenden Lockerungsphänomenen zementierter und zementfreier Protheseschäfte zu verzeichnen ist. Klinisch wurde Polyethylen bis zu diesem Zeitpunkt noch zur direkten Verankerung in den Knochen empfohlen ( Bobyn et al. 1987; Endler et al. 1983; Morscher und Dick, 1983). Diese Anwendung gilt heute als überholt. Derzeit ist die Wirkung einer Reihe von Zytokinen, welche durch stimulierte Makrophagen ausgeschüttet werden, Gegenstand zahlreicher Untersuchungen ( Haynes et al. 2000; Murray et al. 1998; Wilke et al. 1999). Die Phagozytose kleiner Abriebpartikel bei obengenannter Prothesenartikulation verursacht eine Makrophagenstimulation. Dabei kommt es zur Ausschüttung von Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , der eine Stimulation der Osteoklasten sowie eine Hemmung der Osteoblasten bewirkt. Ähnliches verursacht die Ausschüttung von Interleukin 1 $\beta$ . Auch eine Freisetzung von Interleukin 6 durch den Makrophagen führt zu einer Stimulation der Osteoklasten, wie die Osteolysen beim Plasmozytom verdeutlichen.

Allerdings ist anzumerken, daß es sich hierbei um Verschleißerscheinungen des Polyäthylens in der Implantat-Knochengrenzfläche unter Erzeugung stark ausgeprägter Fremdkörperreaktionen mit zum Teil schwerem lokalen Knochensubstanzverlust (Andrew et al., 1986; Rosso et al., 1988) handelt, wobei der an der Prothesenschaft-Knochengrenze entlangkriechende Polyäthylen-Abrieb als Auslöser dieser sog. aggressiven Granulome gilt (Antony et al., 1990; Maloney et al., 1990; Tanzer et al., 1992). Es ist daher zu bedenken, inwieweit ein über 14 Tage angelegtes In-vitro-Experiment Aufschluß über Phänomene geben kann, die durch Abrieberscheinungen über einen längeren Zeitraum bedingt zu sein scheinen, wobei allerdings gerade die Kultivierung über 14 Tage einen Zeitraum beinhaltet, in dem klinisch betrachtet erste Wundheilungsprozesse häufig abgeschlossen sind, sodaß die FACS-Ergebnisse in dieser Hinsicht als ein korrelativer Parameter zu betrachten sind.

Desweiteren zeigten sich allerdings keine signifikanten Zellzahlunterschiede beim Reintitan und bei der durch ODH Behandlung veredelten Titanlegierung, welches auch in vivo möglicherweise keine differente Gewebereaktion erwarten läßt (Wilke et al. 1995).

Bei der FACS-Analyse der Osteokalzin-positiven Zellen zeigen sich deutlich unterschiedliche Verteilungsmuster. Während Keramiken und Titanlegierungen eine ähnliche Anzahl an diesen Zellen aufweisen (ca. 4,5%), ist ihre Zahl, auf den Polymeroberflächen befindlichen, deutlich geringer (1,3%). Diese den reifen



Osteoblasten charakterisierende Zellen sind für den knöchernen Einbau des Biomaterials in das Wirtsgewebe von einiger Bedeutung und lassen einen besseren knöchernen Einbau des Implantates bei den Keramiken und Titanlegierungen vermuten als bei den polymeren Biomaterialien. Dies bestätigt sich in Experimenten mit Hydroxylapatitkeramiken in Bezug auf ihr Einwachsverhalten bei denen es gelang, einen direkten knöchernen belastbaren Verbund zwischen neugebildetem Knochen und HA-Schicht zu vermitteln (Orth et al., 1992; Osborn et al., 1987; Winter et al., 1981). Dabei waren die histologischen Befunde insofern zu interpretieren, als daß eine rasche Differenzierung von Osteoblasten aus dem im Knochenmark immer vorhandenen Progenitorzellen mit direkter Knochenneubildung auf der HA-Schicht, die schnell Anschluß an den Kallus der endostalen Knochenwunde fand, initiiert wurde (Griss et al., 1993). Die Verbindung war so stabil, daß bei Ausreißversuchen der entstandene Bruch in der Regel entweder innerhalb der HA-Schicht oder in der Grenzfläche der HA-Schicht zum Trägermaterial zu finden war und nicht zwischen Knochen und HA-Schicht (Orth et al., 1992). Diese experimentelle Befunde wurden durch die Auswertung klinischer Reoperations- und Autopsiefälle bestätigt (Hardy et al., 1991; Osborn et al., 1987). Eine hohe Anzahl an Osteoblasten auf den Probenmaterialien kann als positiv in Hinblick auf eine spätere Osseointegration des Prothesenmaterials in situ angesehen werden.

#### **4.2.4 Langzeitkultivierung von humanen Knochenmarkszellen**

Die Langzeitkultur, zunächst angelegt, um über den normalen Kulturzeitraum von zwei Wochen hinaus Erkenntnisse bezüglich des Proliferations- und Wachstumsbestrebens sowie der Differenzierung und Metabolik der kultivierten Zellen zu erhalten, konnte ohne die zunächst befürchteten Komplikationen, wie Zelltod oder mikrobieller Kontamination der Kultur, durch sorgfältige Vorgehensweise über einen Zeitraum von sechs Monaten unterhalten werden. Die eigentliche morphologische Beurteilung jedoch gestaltete sich schwieriger, da aufgrund starker Bildung fibrillärer Strukturen ab dem 80. Tag eine lichtmikroskopische Beurteilung unmöglich wurde. Verschiedene durchgeführte Färbungen (v. Kossa, Neu-Fuchsin) wiesen Kalzifizierung der ECM nach. In der REM-EDX-Analyse findet man nach zwei Wochen Kulturdauer in den extrazellulären Matrixanteilen hohe Anteile von Kohlenstoff, Natrium und Schwefel. Nach drei Monaten Kulturdauer ist der Kohlenstoff, Natrium und Schwefel-Peak auf die

Hälfte zurückgegangen. Deutlich sind in der REM-EDX-Analyse der Langzeitkultur von humanen Knochenmarkzellen auf Reintitan ein Phosphat und Kalzium-Peak zu sehen, die möglicherweise mit der Mineralisierung der extrazellulären Matrix zusammenhängen. Eine Analyse der Keramiken mit der REM-EDX Untersuchung der Langzeitkultur war wegen des hohen Kalzium-Phosphatgehalts der Keramiken nicht möglich bzw. sinnvoll.

Die v. Kossa-Versilberung auf den Oberflächen der Keramiken und Titanlegierungen dunkelgefärbte Strukturen aufzeigte, die als mineralisierte extrazelluläre Matrix anzusehen sind. Mit zunehmender Kulturdauer stieg der Gehalt dieser dunkelgefärbten, mineralisierten Strukturen auf den Keramik- und Titanoberflächen, ein Ergebnis, welches in Korrelation zu klinischen und tierexperimentellen Untersuchungen steht, die ebenfalls die meisten mineralisierten Bestandteile auf Hydroxylapatitkeramiken und Reintitanproben aufwiesen (Cook et al., 1988; Geesink et al., 1988; Osborn et al., 1985; Wilke et al., 1993, 1994; Orth et al., 1990; Mathiesen et al., 1987).

Auch in der Langzeitkultur zeigte sich kein materialbedingter Unterschied zwischen Reintitan und der ODH veredelten Titanlegierung.

#### **4.2.5 Dot-Blot**

Mit Hilfe des Dot-Blots gelang es Entwicklungen bezüglich verschiedener Substrate der ECM zu registrieren, die wie eingangs erwähnt eine tragende Rolle bei der chemotaktischen Anziehung und Bindung von knochenformenden Zellen spielen (Serre et al., 1990). Dabei war auffällig, daß die Keramiken die größte Menge an Kollagen I und III aufwiesen, wobei Kollagen I am stärksten vertreten war. Die Festigkeit eines Gewebes ist stark abhängig von dessen Gehalt an Kollagenfibrillen sowie deren Dicke und Quervernetzung untereinander, wobei Anzahl und Dicke der Kollagenfibrillen des Typs I signifikant von der Koexistenz des Kollagens Typ III beeinflusst wird. Die Zahl der Kollagenfibrillen Typ III ist positiv korreliert mit der Zahl an Typ I-Fibrillen, jedoch negativ korreliert mit deren Faserdicke (Wilke et al. 1996). Die Ergebnisse des Dot-Blots lassen aufgrund der Verteilung des Kollagens darauf schließen, daß die Hydroxylapatitkeramik die beste Voraussetzung im Hinblick auf eine feste knöcherne Verankerung bietet. Diese Vermutung deckt sich mit den Erkenntnissen belasteter Tierexperimente (Griss et al., 1993) der letzten Jahre, die unter dem Stichwort der

"biologischen Verankerung" Hydroxylapatitbeschichtungen überwiegend auf Titanen intensiv untersuchten (Furlong et al., 1991) und nach 4 Wochen Implantatverweildauer ein bindegewebiges Interponat, nach 12 bis 24 Wochen Verweildauer einen direkten Knochentitankontakt feststellten. Dabei zeigte sich in der Knochenhistologie 6 Wochen nach Implantation im Göttinger Minischwein eine vollständige Osseointegration von HA-beschichteten Titanprobenkörpern, ein unvollständiger knöcherner Einbau von Reintitan und schließlich keine Osseointegration im Falle von Polyäthylen-beschichteten Titanprobenkörpern (Orth et al. 1989). Die Werte für die alkalische Phosphatase als Enzymmarker für knochenbildende Zellen (Bianco et al., 1990) bzw. für "osteoblastenähnliche Zellen" (Burkhardt et al., 1992) lagen, vergleichbar mit den Ergebnissen für Kollagen III, am höchsten bei den getesteten Keramiken, am geringsten bei den Polymeren. Im Falle des Osteokalzins ist der Schwerpunkt des Interesses nicht in erster Linie auf Unterschiede zwischen den einzelnen Materialgruppen zu legen, bei denen die Werte nicht signifikant voneinander verschieden sind, sondern vielmehr auf das nahezu einheitliche Auftreten Osteokalzin-positiver Zellen zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Kultur (48. Tag). Untersuchungen Biancos (Bianco et al., 1990) folgend kommen alkalischer Phosphatase und Osteokalzin bezüglich der Neubildung und Mineralisierung von Knochensubstanz die Funktion von Markersubstanzen zu, die unterschiedliche zeitliche Entwicklungsstadien der Osteogenese kennzeichnen. Demnach repräsentiert das Auftreten alkalischer Phosphatase die Frühphase der Knochenentwicklung, während ein Nachweis Osteokalzin-positiver Zellen hingegen für eine spätere Phase in der Knochenentstehung spricht. Diese Tatsache bietet eine Erklärung für das zeitlich verschiedene Auftreten der beiden Markersubstanzen und zeigt einmal mehr die unterschiedliche induktive Wirkung der Biomaterialien auf eine Knochenneubildung.

### **4.3 Die getesteten Biomaterialien**

In der vorliegenden Untersuchung kamen Biomaterialien aus unterschiedlichen Werkstoffklassen zur Anwendung. Dabei handelte es sich um Materialien aus der Substanzklasse der Keramiken, der Polymere und der Metalle. In der Gruppe der Metalle befanden sich, anders als bei den übrigen Gruppen, zwei Vertreter, eine Titanlegierung sowie Titan in seiner Reinform. Der Titanlegierung galt besonderes Augenmerk, da durch diese oberflächenveredelte Legierung ein Werkstoff an die Stelle

des seit Jahren in der Endoprothetik benutzten Reintitans tritt, der auf der einen Seite dem Reintitan ähnlich günstige Eigenschaften im Hinblick auf die Biokompatibilität aufweist, auf der anderen Seite jedoch aufgrund seiner biomechanischen und tribologischen Beschaffenheit dem Reintitan ausgesprochene Vorzüge aufweist, welche sich in einer geringeren Verschleißneigung zeigen und damit die eingangs erwähnten Gefahren durch Abriebpartikel drastisch reduzieren kann.

Desweiteren haben wir um einen kritischen Ergebnisvergleich mit anderen Zellkultursystemen zu führen um folgenden die Ergebnisse verschiedener Forschungsgruppen, die mit Biomaterialien und Zellkulturen arbeiten, tabellarisch aufgeführt.

#### **4.3.1 Hydroxylapatitkeramik**

Sowohl in zahlreichen vorangegangenen Untersuchungen (de Bruijn et al., 1992; Uchida et al., 1987; Bagambisa et al., 1990; Harmand, 1986; Lange, 1989; Malik, 1992; Rout, 1987; Teti, 1991; Uchida, 1987) als auch in den Analysen dieser Arbeit wurde eine ausgezeichnete Biokompatibilität von Hydroxylapatitkeramiken deutlich, obwohl die durchgeführten Untersuchungen zum Teil auf unterschiedlichen Testverfahren basierten. Die Ursache hierfür dürfte in der sehr hohen Affinität zwischen der Zusammensetzung der Keramiken und der Morphologie der Knochensubstanz liegen (Jarcho et al. 1977), sowie der histologischen Ähnlichkeit zwischen Hydroxylapatitkeramik und Knochen. So zeigten Untersuchungen der mineralischen Komponente des Knochens einen Anteil an Hydroxylapatit von 70% (Osborn, 1985, 1987; Rahn, 1994). Eine weitere Begründung für die gute Biokompatibilität stellt das Bestreben von Hydroxylapatitkeramiken zur Verbundosteosynthese, d.h. zum physiologischen Verbund durch direkte Anlagerung körpereigener Proteine und Kollagene dar (Osborn, 1987). So ließ sich aus histologischen Befunden im belasteten Tierexperiment herleiten, daß wahrscheinlich im Knochenmark vorhandene Vorläuferzellen zu Osteoblasten differenzieren und zu einer direkten Knochenbildung auf der HA-Schicht führen (Orth et al., 1992). Im Vergleich mit anderen Zellkultursystemen zeigte sich bei den Hydroxylapatitkeramiken eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse.

<b>Material: Hydroxylapatit</b>			
<b>Zellart</b>	<b>Autor</b>	<b>Methode</b>	<b>Ergebnis</b>
Humane Osteoblasten, Gingival-fibroblasten, Osteoblasten (Ratte)	Lang et al, 1989	Extraktionsmethode	Bei höchster Konzentration der Extrakte leichte Wachstumseinschränkung
Humane Osteoblasten, Osteoblasten (Ratte)	Gregoire et al, 1990	Pulverisiertes Material zur Kultur	Die Zellen phagozytierten die Materialpartikel und zeigen gesteigerte Proliferation
Humane Osteoblasten	Bagambisa und Joos, 1990	Direkt Kontakt	Gutes Wachstum der Zellen und Ausbildung eines Zellrasens auf der Keramik und in den Poren, Nachweis von fibrillären ECM
	Begley et al, 1993	Direkt Kontakt	Gutes Wachstum der Zellen im engen Kontakt mit der Keramik, als sehr gut biokompatibel bewertet
Humane Knochenmarkzellen	Wilke et al, 1991, 1992, 1993a, 1994	Direkt Kontakt	Ausgezeichnete Adhäsion und Wachstum der Zellen auf der Keramik, Nachweis von ECM, keine Zeichen der Zellschädigung (Vitalfärbung)
Humane Gingiva-fibroblasten	Gregoire et al, 1987	Pulverisiertes Material zur Kultur	Steigerung des Zellwachstums
	Krüger et al, 1988	Extraktionsmethode	Geringe Hemmung der Zellproliferation (DNA-Synthesemessung) aber keine Zeichen der Zellschädigung

Zellart	Autor	Methode	Ergebnis
Osteoblasten (Ratte)	Rout et al, 1987	Direkt Kontakt	Gutes Wachstum der Zellen auf der Keramik, keine Zeichen der Zellschädigung, Nachweis mineralisierter ECM
	Puleo et al, 1991	Direkt Kontakt	Zellproliferation initial verringert, Nachweis von Kollagensynthese
Periostzellen (Ratte)	Teti et al, 1991	Pulverisiertes Material zur Kultur	Keine Beeinflussung des Zellwachstums (DNA-Synthesemessung), die Keramik wurde als völlig inert bewertet
Knochenmarkzellen (Ratte)	Uchida et al, 1987	Direkt Kontakt	Gutes Wachstum der Zellen auf der Keramik und Ausbildung eines fibrösen Gewebes
	de Bruijn et al, 1992	Direkt Kontakt	Nachweis einer elektronendichten Schicht sowie einer fibrillären mineralisierten ECM
Periostzellen (Rind)	Jones et al, 1988	Direkt Kontakt	Gutes Wachstum der Zellen auf dem Material, Nachweis von ECM

### 4.3.2 Reintitan

Bereits seit den vierziger Jahren ist die Biokompatibilität und hohe Korrosionsbeständigkeit von Reintitan bekannt. Mikrostrukturierte Titanoberflächen stabil fixierter Implantate besitzen die Fähigkeit zur Osteointegration, eine Eigenschaft, die, abgesehen von Legierungen auf Titanbasis, kein anderes gebräuchliches metallisches Biomaterial besitzt (Schmidt et al., 1996). In unterschiedlichen Testverfahren wurde übereinstimmend die gute Biokompatibilität von Reintitan und dessen Legierungen herausgestellt (Davies et al., 1990; Goldring et al., 1990; Howlett et al., 1994; Kawahara et al., 1968; Koekoenen et al., 1992; Kotoura et al., 1985; Lowenberg et al., 1991; Maurer et al., 1994; Puleo et al., 1993; Semlitsch et al., 1984). Auch die Testergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die guten, bioverträglichen Eigenschaften des Titans, welche dicht hinter denen der Keramiken folgen. Im Vergleich mit anderen Forschergruppen wurde in der Bewertung der Verträglichkeit von Reintitan eine sehr gute Übereinstimmung festgestellt. Trotz verschiedener verwendeter Zellarten und Untersuchungsmethoden wurde eine gute Biokompatibilität ermittelt.

<b>Material: Titan</b>			
<b>Zellart</b>	<b>Autor</b>	<b>Methode</b>	<b>Ergebnis</b>
Humane Gingivafibroblasten	Hehner et al, 1989	Direkt Kontakt	Gutes Wachstum der Fibroblasten auf der Titanoberfläche, keine Zeichen der Zellschädigung
	Harmand et al, 1990	Direkt Kontakt	Leicht verminderte Proliferation
	Kasten et al, 1990	Direkt Kontakt	<b>Gutes Zellwachstum</b>
	Simion et al, 1991	Direkt Kontakt	Gute Adhäsion und Wachstum der Zellen
	Naji et al, 1991	Direkt Kontakt	Leicht verminderte Adhäsion und Proliferation
	Koekoenen et al, 1992	Direkt Kontakt	Oberflächenbeschaffenheit hat Einfluß auf die Biokompatibilität, bestes Zellwachstum auf glatter Oberfläche
	Berstein et al, 1992	Direkt Kontakt	Gute Biokompatibilität
	Hanawa et al, 1992	Agar Overlay	Keine Zeichen der Zellschädigung

Zellart	Autor	Methode	Ergebnis
Humane dermale Fibroblasten	Goldring et al, 1990	Direkt Kontakt	Gutes Zellwachstum und Synthese von Typ-1 Kollagen
	Putters et al, 1992	Direkt Kontakt	Keine Zeichen der Zellschädigung, Titan wurde als inert eingestuft
Humane Synovialfibroblasten	Rae et al, 1986	Pulverisiertes Material zur Kultur	Leichter LDH-Anstieg jedoch keine morphologischen Schädigungen der Zellen
Humane Knochenzellen	Howlett et al, 1994	Direkt Kontakt	Gutes Zellwachstum
	Harmand et al, 1990	Direkt Kontakt	Verminderte Zellproliferation
	Naji et al, 1991	Direkt Kontakt	Verminderte Proliferation und Zelldifferenzierung
	Goldring et al, 1990	Direkt Kontakt	Gutes Wachstum der Zellen und Produktion von Typ-1 Kollagen
Humane Knochenmarks-zellen	Wilke et al, 1991,1992, 1993a,1994,	Direkt Kontakt	Gutes Zellwachstum, Nachweis von Extrazellulärmatrix
Humane Monozyten	Ciapetti et al, 1993	Extraktions-methode	Zellvitalität nicht beeinträchtigt (MTT-Assay)
	Puleo et al, 1993	Extraktions-methode	Zellvitalität nicht beeinträchtigt
Fibroblasten (Maus)	Kawahara et al, 1968	Direkt Kontakt	Keine Zeichen der Zellschädigung
	Maurer et al, 1994	Direkt Kontakt	Keine Toxizität feststellbar
Fibroblasten (Hühnerembryo)	Knöfler et al, 1985	Direkt Kontakt	Gutes Wachstum auf der Titanoberfläche
Fibroblasten (Hamster)	Kotoura et al, 1985	Direkt Kontakt	Gutes Zellwachstum, keine Zeichen der Zellschädigung
	Cannas et al, 1988	Direkt Kontakt	Sehr gute Adhäsion der Zellen auf der Titanoberfläche



Zellart	Autor	Methode	Ergebnis
Epithelzellen (Schwein)	Gould et al, 1981	Direkt Kontakt	Enger Kontakt der Zellen mit der Materialoberfläche, keine Zeichen der Zellschädigung
Epithelzellen (Ratte)	Neupert et al, 1986	Direkt Kontakt	Ausbildung eines konfluenten Zellrasens
Makrophagen (Maus)	Rae et al, 1975	Direkt Kontakt	Keine Zeichen der Toxizität feststellbar
	Rae et al, 1986	Pulverisiertes Material zur Kultur	Keine morphologischen Schädigungen feststellbar, leichter Anstieg lysosomaler Enzyme als Zeichen einer geringen entzündlichen Reaktion
Knochenzellen (Rind)	Jones et al, 1988	Pulverisiertes Material zur Kultur	Zellwachstum nicht beeinflusst
Knochenzellen (Maus)	Itakura et al, 1988	Direkt Kontakt	Gutes Zellwachstum (DNA, Proteinmessung)
	Craig et al, 1990	Direkt Kontakt	Keine Zellschädigung (Vitalfärbung)
Knochenmarkszellen (Ratte)	Davies et al, 1990	Direkt Kontakt	Gutes Wachstum der Zellen, Nachweis mineralisierter ECM
Knochenmarkszellen (Ratte)	Lowenberg et al, 1991	Direkt Kontakt	Direkter Kontakt der Zellen auf der Titanoberfläche, Nachweis von ECM
Chondrozyten (Ratte)	Boyan et al, 1993	Direkt Kontakt	Gutes Wachstum der Zellen

#### 4.3.3 Ti6Al7Nb-ODH

Titanlegierungen finden eine breite Anwendung in der Hüft- und Kniegelenkendoprothetik (Kienapfel et al., 1991; Sarmiento et al., 1985, 1988). Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse ergaben keinen signifikanten Unterschied in der Biokompatibilität von Reintitan und der Titanlegierung Ti6Al7Nb-ODH. Beide Werkstoffe zeichneten sich durch eine hervorragende Biokompatibilität aus, was für die Titanlegierung bedeutet, daß sie die ausgezeichneten biokompatiblen Eigenschaften des Reintitans mit den tribologischen Vorzügen dieser Legierung mit verminderter

Abriebwahrscheinlichkeit verbindet. Der untersuchte Probenkörper zeichnete sich des weiteren durch eine mit Sauerstoff gehärtete Oberfläche aus, die einen zusätzlichen Schutz gegen übermäßige Reibung darstellt und somit eine weitere Abriebsreduktion erreicht. Ti6Al7Nb-ODH bietet damit gegenüber Reintitan bei vergleichbarer Biokompatibilität Vorteile in der klinischen Anwendung. Im Vergleich mit anderen Titan Aluminium Legierungen zeigten sich ähnlich wie beim Reintitan gute Ergebnisse hinsichtlich der Biokompatibilität.

<b>Material: Titan-Aluminium-Vanadium Legierung (Ti-6Al-4V)</b>			
<b>Zellart</b>	<b>Autor</b>	<b>Methode</b>	<b>Ergebnis</b>
Humane Gingivafibroblasten	Lowenberg et al, 1987	Direkt Kontakt	Gute Biokompatibilität, auf glatter Oberfläche bessere Zelladhäsion
	Simion et al, 1991	Direkt Kontakt	Gute Zellwachstum auf der Materialoberfläche, Ausbildung eines konfluenten Zellrasens
	Hehner et al, 1989	Direkt Kontakt	Wachstum der Zellen im engen Kontakt mit der Materialoberfläche, kein Unterschied zu Titan feststellbar
Humane dermale Fibroblasten	Goldring et al, 1990	Direkt Kontakt	Gutes Zellwachstum
Humane Gingiva-epithelzellen	Simion et al, 1991	Direkt Kontakt	Gutes Wachstum der Zellen
	Hehner et al, 1989	Direkt Kontakt	Gutes Wachstum der Zellen
Humane Knochenzellen	Goldring et al, 1990	Direkt Kontakt	Gutes Wachstum der Zellen, Produktion von Kollagen auf der Materialoberfläche

<b>Zellart</b>	<b>Autor</b>	<b>Methode</b>	<b>Ergebnis</b>
Humane Knochenmarks-zellen	Wilke et al, 1992	Direkt Kontakt	Gutes Wachstum der Zellen, Nachweis von EZM auf der Materialoberfläche
Knochenzellen (fetale Ratte)	Puleo et al, 1991	Direkt Kontakt	Rasches Zellwachstum
	Vrouwenfelder et al, 1993	Direkt Kontakt	Gut biokompatibel
	Puleo et al, 1993a	Direkt Kontakt	Durch molekulargenetische Methoden konnte die Expression der Gene für Osteonectin, Osteocalcin und Osteopontin von Zellen im Kontakt mit der Materialoberfläche nachgewiesen werden
Knochenzellen (Hühnerembryo)	Kanematu et al, 1990	Direkt Kontakt	Keine Zeichen der Zellschädigung

#### 4.3.4 Polyäthylen

Polyäthylen weist kontroverse Ergebnisse auf. Nach seiner Einführung und ersten erfolgreichen Anwendung durch Charnley ab 1960 (Charnley, 1960) fand es zunächst eine weite Verbreitung als Pfannenmaterial für Arthroplastiken. Bei zementfreier Insertion wurde Polyäthylen durch eine bindegewebige Membran eingeschieden (Harms und Mäusle, 1980), was zur Einstufung als biotolerantes Material führte. Gegenüber speziell gehärteten, hochglanzpolierten Gusslegierungen sowie der Aluminiumoxydkeramik besitzt Polyäthylen gute Gleiteigenschaften und einen relativ geringen Abrieb (Walter und Plitz, 1991).

Demgegenüber zeigte sich Polyäthylen in der vorliegenden Untersuchung im Vergleich zu den anderen getesteten Materialien als wenig biokompatibel aus. Dieses Ergebnis deckt sich mit denen einer Reihe klinischer Versuche, die die Eigenschaften von Polyäthylen näher beleuchteten. Bis vor wenigen Jahren fand Polyäthylen Anwendung in der direkten zementfreien Verankerung im Knochen (Bertin, 1985; Endler, 1983; Morscher, 1983), das innerhalb weniger Jahre zu schwerem Verschleiß des Polyäthylen

in der Implantat- Knochengrenzfläche unter Erzeugung massiver aggressiver Fremdkörperreaktionen geführt hat (Andrew, 1986, Rosso, 1988). Lockerungsphänomene an zementierten und zementfreien Schäften auf der Basis "aggressiver Granulome" (Antony et al., 1986; Escola et al., 1990; Santavirta et al., 1990) sind in letzter Zeit als "polyethylen disease" in der Literatur beschrieben worden, wobei vor allem im Zusammenhang mit zystischen Umbauten um zementierte und zementfreie Schäfte der an der Schaft-Knochengrenze entlangkriechende Polyäthylenabrieb als Auslöser dieser "aggressiven Granulome" anzusehen ist (Antony et al., 1986; Maloney et al., 1990; Tanzer et al., 1992). In unseren zellkulturellen Ergebnissen zeigte sich, daß insbesondere die Verwendung von Polymeren zu einer Stimulation der Granulozyten und B-Lymphozyten führte. Möglicherweise kommt es in situ zur Ausschüttung von Interleukin 6, Interleukin 1 $\beta$  und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  und in Folge zur Aktivierung von Osteoklasten, die dann osteolytische Effekte (Lockerung) bewirken. Zusammenfassend läßt sich eine Übereinstimmung hinsichtlich der durch die humane Zellkultur und durch klinische Studien ermittelte, eher als schlecht einzustufenden Biokompatibilität von Polyäthylen verzeichnen.

Im Vergleich mit verschiedenen Zellkultursystemen stimmten die Ergebnisse nicht überein.

<b>Material: Ultrahochmolekulares Polyäthylen (UHMWPE)</b>			
<b>Zellart</b>	<b>Autor</b>	<b>Methode</b>	<b>Ergebnis</b>
Humane Knochenmarkszellen	Wilke et al, 1992, 1993a, 1994	Direkt Kontakt	Nur sehr wenig adhärierende Zellen, kein Wachstum nachweisbar
Fibroblasten (Hamster)	Kotoura et al, 1985	Direkt Kontakt	Gutes Zellwachstum, keine Zeichen der Zell-schädigung

#### 4.4 Schlußbetrachtung

Die in dieser Arbeit vorliegenden in vitro ermittelten Ergebnisse spiegeln Entwicklungen wieder, welche in enger Korrelation zu den Resultaten stehen, die auf der Basis klinischer und tierexperimenteller Versuche (in vivo) gewonnen wurden. Die humane Knochenmarkszellkultur kann zum aktuellen Zeitpunkt Testsysteme auf Basis

klinischer Studien und tierexperimenteller Versuchsansätze nicht ersetzen, bestehen doch einige Diskrepanzen zwischen In-vitro- und In-vivo-Testsystemen. Diese Unterschiede beruhen zum einen darauf, daß sich Teile der physiologischen Zellfunktion bei Entnahme aus ihrem physiologischen Umfeld, dem Organismus, verändern (Brandi et al., 1990), zum anderen auf der Tatsache, daß bisherige Ergebnisse aus In-vitro-Ansätzen die Resultate vereinzelter Testsysteme beinhalten, bei denen Wechselwirkungen in vivo nur begrenzt berücksichtigt werden (Owen et al., 1990). So waren z.B. spezifische Reaktionen des Körpers, wie Herzkreislaufbeschwerden bei Verwendung eines keramischen Knochenzements in der Materialtestung mit Zellkulturen nicht ohne weiteres zu erkennen (Dillingham, 1975). Ein weiteres Problem der In-vitro-Testung liegt in der eingeschränkten Potenz, biomechanische Aspekte der verwendeten Prüfkörper ausreichend zu berücksichtigen. Selbst bei hervorragenden biokompatiblen Eigenschaften im In-vitro-Versuch, hängt letztlich der langfristige Erfolg einer implantierten Endoprothese nachhaltig von den biologischen Eigenschaften des Implantatträgers ab, wie von seinem Gesundheitszustand, seinem biologischen Alter, seinem Gewicht und seiner Aktivität, da diese Parameter Einfluß auf den Sitz der Prothese haben und eventuelle Lockerungsphänomene begünstigen können (Bonucci et al., 1989). So beeinflussen postoperative Abriebphänomene, Materialalterung, "inneres Remodelling" und vorhandene physiologische und pathophysiologische Stoffwechselvorgänge, wie zum Beispiel die Osteoporose, die biologische und mechanische Stabilität im klinischen Verbund (Griss et al., 1993).

Die humane Knochenmarkszellkultur ist jedoch als die Screening-Methode aufzufassen, mit der es möglich ist, durch exakte Erforschung der Entwicklung humaner Knochenmarkszellen auf Biomaterialien informative Aussagen über in vivo verwendetes Prothesenmaterial zu gewinnen. Gerade in Hinblick auf die durch Abriebpartikel hervorgerufenen immunologischen Reaktionen bietet die Knochenmarkszellkultur eine hervorragende Analyseapparatur, welche es möglich macht, Vorgänge im periimplantären Gewebe exakt zu erfassen, da die humane Knochenmarkszellkultur über genau die an der immunologischen Antwort im Knochen-Implantatinterface beteiligten Zellen verfügt. Hier ist die humane Knochenmarkszellkultur dem Tierversuch klar überlegen. Eine Korrelation von Ergebnissen tierexperimenteller Versuche mit klinischen Erfahrungswerten ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch nach wie vor unabdingbar (Thomson, 1991; Klötzer,

1988 ). Ferner werden auch in Zukunft tierexperimentelle Arbeiten erforderlich sein, wo z.B. bedeutende Aspekte der Biomechanik nicht berücksichtigt werden können oder systemische Toxizität nicht erfaßbar ist.

In Hinblick auf Abriebphänomene und die damit verbundenen Komplikationen erhält das in dieser Arbeit komparativ zu anderen Werkstoffen getestete Ti6Al7Nb-ODH eine exponierte Stellung. Es wurde deutlich wie wichtig eine Kombination aus hoher Biokompatibilität auf der einen Seite und optimalen tribologischen Eigenschaften auf der anderen Seite ist.

In dieser Arbeit wurde ersichtlich, daß die große Anzahl an unterschiedlichen Zellarten, Testmethoden, Nachweisverfahren und sonstigen Einflußgrößen einen Vergleich der verschiedenen Studien nur bedingt möglich macht. Um eine Vergleichbarkeit der zukünftigen Studien zu ermöglichen wären einheitliche Reglementierungen notwendig.

Schon 1980 wurden ähnliche Überlegungen von der Arbeitsgruppe Biomaterialien der DGOT geäußert (Willert et al, 1980).

Zu fordern wäre:

1. Ausschließliche Verwendung relevanter humaner Zellen, d.h. Zellen die auch in situ in Kontakt mit dem Biomaterial stehen
2. Genau reglementierte Kombination der Testmethoden mit detaillierter Festlegung aller Einflußgrößen (Willert et al, 1980)
3. Verwendung einer Kombination von genau festgelegten Nachweisverfahren
4. Exakte Festlegung der Prüfkörper in chemischer Zusammensetzung, Form und Oberflächenbeschaffenheit.

Die nach genauen Richtlinien durchgeführte Biokompatibilitätsuntersuchung mit in vitro-Zellkulturverfahren eignet sich für die meisten Phasen der Materialuntersuchung

Bestimmte Fragestellungen können auf absehbarer Zeit aber nur im Tierversuch untersucht werden.

Unter kontrollierten Kulturbedingungen kann der Einfluß spezieller Einflußgrößen der Biokompatibilität, wie z.B. unterschiedlicher Oberflächenqualitäten, anhand ausgewählter Zellen detailliert untersucht werden. Hier ist eine weitgehende Vergleichbarkeit der Studien zu erreichen.

Mehr noch als die Vergleichbarkeit der Arbeiten untereinander ist jedoch aber die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die in vivo-Situation von ausschlaggebender Bedeutung. Hierzu ist eine möglichst weitgehende Nachempfindung der in vivo-Bedingungen anzustreben. Dies bedeutet zum Beispiel die Verwendung der Prüfmaterialien in der Form und Oberflächenbeschaffenheit, die der klinischen Anwendung entspricht. Diese speziellen Anpassungen der einzelnen Untersuchungen bedeutet jedoch, daß sich viele Arbeiten in verschiedenen Parametern unterscheiden und daher eine exakte Vergleichbarkeit der Studien untereinander von vorneherein eingeschränkt ist.

Hier kann eine Überprüfung der Ergebnisse insbesondere durch einen Vergleich mit den tierexperimentellen Arbeiten und der klinischen Erfahrung erfolgen.

Die Grenzen, der in vitro-Kulturmethoden werden auch in Zukunft den Einsatz von tierexperimentellen Arbeiten erfordern, wenn z. B. bedeutende Aspekte der Biomechanik nicht berücksichtigt werden können oder wenn eine systemische Toxizität nicht erfassbar ist. Die in vitro-Biokompatibilitätstestung ist ein wesentlicher Teilschritt im Programm der Materialuntersuchung, der jedoch von Fall zu Fall durch Untersuchungen im geeignetem Tiermodell zu ergänzen ist.

#### **4.5 Ziele zellkultureller Experimente**

Die Osseointegration biologischer Materialien in der Endoprothetik sollte auch zukünftig einen Schwerpunkt zellkultureller Untersuchungen darstellen. Testsysteme zur Prädiktion und Verlaufsbeobachtung der Entwicklung von undifferenzierten Progenitorzellen im Hinblick auf ihre Schlüsselfunktion bei der Integration von Implantaten und deren Langzeitverhalten müssen standardisierbar und routinemäßig einsetzbar werden. Dabei muß auch ein großes Augenmerk auf Langzeitkultursysteme gerichtet werden, um nicht nur Momentaufnahmen, sondern auch Prognosen für einen

längeren Zeitraum aufstellen zu können. Wichtig wird jedoch nach wie vor die Korrelierung zellkultureller Experimente mit klinischen und tierexperimentellen Ergebnissen bleiben, um mittelfristig eine standardisierte Methode zur Biomaterialientestung in der Endoprothetik zu erhalten.

Daneben bedeutet die Frage der Allergisierung und Tumorentstehung in der Endoprothetik eine weitere Herausforderung an die humane Knochenmarkszellkultur. Der artikuläre Abrieb und die daraus resultierende Lockerung von Endoprothesen stellt eine große Einflußkomponente auf die Lebensdauer der Prothesen und die damit verbundenen Revisionseingriffe dar. Desweiteren sind bis zum heutigen Tage an lokalen Tumoren im Bereich von Hüftendoprothesen 24 Tumore beschrieben worden, bei denen es sich vorrangig um Sarkome und fibrozytäre Histiozytome handelte (Case et al., 1994). An generalisierten Tumoren fanden u.a. zwei Kohortenstudien in Neuseeland und Finnland ein erhöhtes Auftreten von Leukämie und Tumoren des hämatopoetischen Systems in Verbindung mit Hüftendoprothesen bzw. deren Lockerungen (Gillespie et al., 1988; Visuri et al., 1991).

Das Modell der humanen Knochenmarkszellkultur mit seinen Progenitorzellen und immunkompetenten Zellen bietet über eine lange Kulturdauer die Möglichkeit, die Reaktion auf Abriebpartikel, die mit für die Tumorentstehung diskutiert werden, umfassend zu analysieren. Es hat den Vorteil, daß es zum einen die anatomische Struktur darstellt, mit der ein Endoprothesenwerkstoff in Kontakt kommt, zum anderen den Ort der Immunantwort auf die Exposition von lokal und systemisch wirkenden Substanzen verkörpert. Auf diese Weise ist sie den Zellkultursystemen überlegen, bei denen das eigentliche Effektorgewebe von Prothesenpartikeln nicht berücksichtigt wird, oder eine zu kurze Kulturdauer vorliegt (Haynes et al., 2000; Horowitz et al., 1998). Basierend auf diesen Überlegungen werden Anschlußarbeiten zur Weiterentwicklung dieses Verfahrens an der Universität Marburg durchgeführt.



## 5. Zusammenfassung

Mit Hilfe einer Zellkultur aus humanen Knochenmarkszellen sollten im in-vitro-Experiment Probenkörper von Biomaterialien untersucht werden, die endoprothetische Anwendung in der Orthopädie finden. Dazu wurden humane Knochenmarkszellen unter standardisierten Bedingungen im Rahmen einer Osteotomie aus der Femurhöhle entnommen und in Kultur überführt. Nach vierzehntägiger Kultivierung fand eine Aussaat auf den Oberflächen der in Frage kommenden Biomaterialien statt. Wachstums- und Differenzierungsverhalten sowie Sekretionsprodukte der Zellen wurden mittels entsprechend geeigneter Verfahren eingehend untersucht.

Proben aus den Bereichen der Keramiken, Metallen und Kunststoffe fanden Eingang in die Untersuchung. Als Probenkörper wurden eine Hydroxylapatitkeramik, Reintitan, eine Titanlegierung (Ti6Al7Nb-ODH) und Polyäthylen verwandt.

Vor der Zellaussaat auf die entsprechenden Biomaterialien wurden diese mittels energiedispersiver Röntgenanalyse auf ihre Elementarzusammensetzung und Oberflächengeometrie untersucht. Eine Analyse der den Biomaterialien anhaftenden Zellen erfolgte nach vierzehntägiger Kulturdauer in Form einer Aufricht- und Rasterelektronenmikroskopie. Dabei galt besondere Aufmerksamkeit der Zellzahl, der Zellmorphologie sowie den entstehenden Sekretionsprodukten.

Zur Betrachtung der unterschiedlichen Differenzierung der Knochenmarkszellen dienten immunologische Methoden. Mit Hilfe der Durchflußzytometrie und der Blot-Analyse gelang eine semiquantitative Bestimmung der Zelldifferenzierung und der Sekretionsprodukte aus dem Überstand.

In einer angelegten Langzeitkultur konnte das Mineralisationsverhalten von Knochenmarkszellen demonstriert und untersucht werden.

In der durchgeführten Analyse zeigten sich in erster Linie die Zellzahl pro Prüfkörper, die Anzahl vitaler Zellen sowie die Menge der faserigen Interzellularsubstanz als suffiziente Parameter für den Vergleich und die Bewertung der Biokompatibilität.

Unter diesen Prämissen erwies sich die Hydroxylapatitkeramik als bestes Material. Im Mittelfeld befanden sich Reintitan und Ti6Al7Nb-ODH mit einer untereinander vergleichbaren Biokompatibilität. Die schwächsten Ergebnisse erzielte der Kunststoff Polyäthylen.

Im Hinblick auf die mittels der Durchflußzytometrie semiquantitativ ermittelte Zelldifferenzierung zeigten sich materialbedingte Unterschiede. Auf den Probenkörpern aus Polyäthylen fanden sich vergleichsweise hohe Zahlen von Granulozyten und B-Lymphozyten, dagegen relativ geringe Anzahlen an Osteoblasten bei einer hohen Anzahl avitaler Zellen. Eine Korrelation zeigte sich zwischen den mit der Dot-Blot-Analyse semiquantitativ erhobenen Ergebnissen zu fasrigen Bestandteilen im Zellüberstand und den mit Hilfe von immunhistologischen Methoden gewonnenen Ergebnissen der Zelldifferenzierung. Im Überstand der Kunststoffprobenkörper waren vergleichsweise geringe Mengen an Kollagen I und III, Osteokalzin und Alkalischer Phosphatase nachweisbar.

Des weiteren konnte nach einer Phase der sechsmonatigen Kultivierung in Langzeitkultur die Kalzifizierung der extrazellulären Matrix vorrangig bei Keramik- und Titanprobenkörpern nachgewiesen werden.

Abschließend ist festzuhalten, daß die Ergebnisse dieser Arbeit in hohem Maße mit Untersuchungen zur Biokompatibilität vergleichbarer Werkstoffe in Mensch und Tier korrelieren und zu den Resultaten entsprechender in-vitro-Studien internationaler Arbeitsgruppen Parallelen aufweisen.

Das vorgestellte System ist somit als ein geeignetes Screeningverfahren zur Bewertung der Biokompatibilität von Implantatmaterialien zu betrachten.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Andrew, T.A.; Flanagan, J.P.; Gerundini, M.; Bombelli, R.**  
The isoelastic noncemented total hip arthroplasty. Preliminary experience with 400 cases.  
Clin. Orthop., 1986, 206, 127.
2. **Antony, P.P.; Gie, G.A.; Howie, C.R.; Ling, R.S.M.**  
Localized endosteal bone lysis in relation to the femoral components of cemented total hip arthroplasties.  
J. Bone Jt. Surg., 1990, 72b, 971.
3. **Bagambisa, F.B.; Joos, U.**  
Preliminary studies on the phenomenological behaviour of osteoblasts cultured on hydroxyapatite ceramics.  
Biomaterials, 1990, 50-56.
4. **Beleites, E.; Klinger, O.; Zeleme, N.; Milosevski, M.**  
Kontrastierung von Knochen und Implantatwerkstoffen.  
Progress report on biomaterials.  
Hrsg.: Forschungszentrum Jülich GmbH., Zentralbibliothek, 1993, 82-110.
5. **Bell, B.**  
A system of surgery.  
Penniman, Troy N.Y., 1804.
6. **Berstein, A.; Bernauer, I.; Marx, R.; Geurtsen, W.**  
Human cell culture studies with dental metallic materials.  
Biomaterials, 1992, 13 (2), 98-100.
7. **Bertin, K.C.; Freeman, M.A.R.; Morscher, E.; Oeri, A.; Ring, P.**  
Cementless acetabular replacement using a pegged polyethylene prosthesis.  
Arch. Orthop. Trauma Surg., 1985, 104, 251-261.
8. **Bianco, P.; Fedarko, N.S.; Bonucci, E.; Termine, J.D.; Robey, P.G.**  
Acid and alkaline phosphatase activities of bone cells revisited.  
BIOSIS-International Society for Bio-analoging Skeletal Implants.  
Annual Meetings, Vevey, 1989, 17-27.

9. **Bianco, P.; Fisher, L.W.; Young, M.F.; Bonucci, E.; Robey, P.G.; Termine, J.D.**  
The expression of bone proteins in tissues.  
BIOSIS-International Society for Bio-analoging Skeletal Implants.  
Annual Meetings, Montreux, 1990, 73-79.
10. **Bobyn, J.D.; Engl, C.A.; Glassmann, A.H.**  
Histological analysis of a retrieved microporous coated femoral prosthesis. A seven year case report.  
Clin. Orthop., 224, 303-310 (1987)
11. **Bonucci, E.; Mocetti, P.; Moreschini, O.; Berni, S.; Bianco, P.**  
Pathological aspects in prosthesis failure.  
BIOSIS-International society for Bio-analoging Skeletal Implants.  
Annual Meetings, Vevey, 1989, 37-41.
12. **Boskey, A.L.**  
Noncollagenes matrix proteins and their role in mineralisation.  
Bone Min., 1989, 6, 111-123.
13. **Bradley, T.R.; Metcalf, D.**  
The growth of mouse bone marrow cells in vitro.  
Aust. J. Exp. Biol. med. Sci., 1966, 44, 287.
14. **Brandi, M. L.**  
Social behaviour of bone-derived cells in tissue culture.  
BIOSIS-International society for Bio-analoging Skeletal Implants.  
Annual Meetings, Montreux, 1990, 57-59.
15. **Brauner, A.; Kaden, P.**  
Die Zellkultur humaner Gingivafibroblasten zur biologischen Prüfung von in der Mundhöhle verwendeten Materialien.  
Zeitschrift für Stomatologie, 1989, 86 (8), 533-538.
16. **Browne, R.; Tyas, M.**  
Biological testing of dental restorative materials in vitro - a review.  
Journal of Oral Rehabilitation, 1979, 6, 365-374.
17. **Brujin de, J.D.; Klein, C.; Groot de, K.; Blitterswijk, C.A.**  
The ultrastructure of the bone-hydroxyapatite interface in vitro.  
Journal of Biomedical Mat. Res., 1992, 26, 1365-1382.

- 18. Burkhardt, R.**  
Der Osteoblast: Schlüssel zum Verständnis des Skelettorgans.  
Osteologie, 1992, 1(3), 139-170.
- 19. Cantrell, M.A.; Anderson, D.; Ceretti, D.P.**  
Cloning, sequence and expression of a human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.  
Proc. Natl. Acad. Sci., 1985, 82, 6250-6254.
- 20. Caughman, F.; Caughman, G.; Dominy, W.; Schuster, G.**  
Glass ionomer and composite resin cements: Effects on oral cells.  
Journal of Prosthetic Dentistry, 1990, 63, 513-521.
- 21. Case, C. P.; Langkamer, V. G.; James, C.**  
Widespread dissemination of metal debris from implants.  
J. Bone Joint Surg., 76 B, 701-712, 1994
- 22. Charnley, J.**  
Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur.  
J. Bone Jt. Surg., 1960, 42 B, 28.
- 23. Cook, S.D; Thomas, K.A; Kay, J.F.; Jarcho, M.**  
Hydroxyapatite-coated porous titanium for use as an orthopedic biologic attachment system.  
Clin. Orthop., 1988, 230, 303-312.
- 24. Davies, J.E.**  
In vitro modelling of the bone/implant interface.  
The Anat. Rec., 1996, 245, 426-445.
- 25. Davies, J.E.; Shiga, A.; Lowenberg, B.**  
The bone-titanium interface in vitro.  
J. Biomed. Mater. Res. 1990, 24, 1289-1306.
- 26. de Bernard, B.; Bianco, P.; Bonucci, E.; Constantini, M.; Lunazzi, G.C.; Modricky, C.; Moro, L.; Panfili, E.; Pollesello, P.; Stagni, N.; Vittur, F.**  
Biochemical and immunohistochemical evidence that in cartilage an alkaline phosphatase is a  $\text{Ca}^{2+}$ -binding glycoprotein.  
J. Cell. Biol., 1986, 103, 1615-1623.

27. **de Lange, G.L.; Donath, K.**  
Interface between bone tissue and implants of solid hydroxyapatite or hydroxyapatitecoated titanium implants.  
Biomaterials, 1989, 121-125.
28. **Dexter, T.M.; Allen, T.D.; Lathja, L.G.**  
Conditions controlling the proliferation of hemopoietic stem cells in vitro.  
J. Cell. Physiol., 1977, 91, 335-344.
29. **Dillingham, K.; Webb, N.; Lawrence, H.; Autian, J.**  
Biological evaluation of polymers 1. Poly(methylmethacrylate).  
Journal of Biomedical Mat. Res., 1975, 9, 569-596.
30. **Dixon, C.; Rickert, U.**  
Tissue tolerance to foreign materials.  
Journal of the American dent. Association, 1933, 20.
31. **Endler, M.; Plenk, H.; Grundschober, G.; Girtler, D.; Schnabl, H.**  
Ergebnisse der experimentellen Prüfung einer einschraubbaren Hüftgelenkspfanne aus Polyäthylen beim Schaf.  
Z. Orthop., 1983, 121, 64-73.
32. **Escola, A.; Santavirta, S.; Konttinen, Y.T.; Hoikka, V.; Tallroth, K.; Lugholm, T.B.**  
Cementless revisions of aggressive granulomatous lesions of hip replacements.  
J. Bone Jt. Surg., 1990, 72b, 212.
33. **Fasol, R.; Zilla, P.; Groscurth, P.; Wolner, E.; Moser, R.**  
Experimental in vitro cultivation of human endothelial cells on artificial surfaces.  
Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs., 1985, 276-283.
34. **Folkman, J.; Maskons, A.**  
Role of cell shape in growth control.  
Nature, 1978, 273, 345-349.
35. **Freund, M.**  
Der GM-CSF: Erfahrungen, Möglichkeiten, Perspektiven.  
Sandorama, 1989, 4, 16-19.
36. **Furlong, P.**  
Fixation of hip prostheses by hydroxyapatite ceramic coatings.  
J. Bone Jt. Surg., 1991, 73b, 741-745.

37. **Galante, J.; Rostoker, W.; Lueck, R.; Ray, R.D.**  
Sintered fiber metal composites as a basis for attachment of implants in bone.  
J. Bone Jt. Surg., 1971, 53 A, 101.
38. **Geesink, R.G.R.; de Groot, K.; Klein, C.P.A.T.**  
Bonding of bone to apatite-coated implants.  
J. Bone Jt. Surg., 1988, 70b, 17-22.
39. **Gillespie, W.J.; Frampton, C.M.A.; Henderson, R.J.; Ryan, P.M.**  
The incidence of cancer following total hip replacement.  
J. Bone Joint Surg., 70 B, 539-542, 1988
40. **Gillis, J.D.; Urdal, D.; Clevenger, W.; Klinke, R.; Sassenfeld, H.; Price, V.; Cosman, D.**  
Production recombinant human colony stimulating factors in yeast.  
Behr. Inst. Mitt., 1988, 83, 1-7.
41. **Goldring, S.; Flannery, M.; Petrisson, K.; Evins, A.; Jasty, M.**  
Evaluation of connective tissue cell responses to orthopaedic implant materials.  
Connective Tissue Res. 1990, 24 (1), 77-81.
42. **Griss, P.; Heimke, G.; Krempien, B.; Silber, R.; Haehner, K.; Merkle, B.**  
Erste Erfahrungen mit der Keramik-Metallverbundprothese.  
Medizinisch-orthopädische Technik, 1975, 6, 95, 159-162.
43. **Griss, P.; Heimke, G.; Krempien.**  
Experimentelle Untersuchungen über die Verträglichkeit von  
Keramikwerkstoffen.  
Medizinisch-orthopädische Technik, 1976, 96, 105-106.
44. **Griss, P.; Orth, J.; Wilke, A.; Franke, P.**  
Gesichertes und Neues aus der Biomaterialienforschung.  
Z. Orthop. 1993, 131, 488-495.
45. **Grote, J.J.; van Blitterswijk, C.A.; Kuijpers, W.**  
Hydroxyapatite ceramics as middle ear implant material: animal experimental  
results.  
Annals of Otology, Rhinology and Laryngology, Suppl., 1986, 123, 1-5.
46. **Guess, W.; Rosenbluth, S.; Schmidt, B.; Autian, J.**  
Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell  
monolayers.  
Journal of Pharm. Sci., 1965, 54, 1545-1547.

47. **Hardy, D.C.R.; Frayssinet, P.; Guilhem, A.; Lafontaine, M.A.; Delince, P.E.**  
Bonding of hydroxyapatite-coated femoral prostheses. Histopathology of specimens from four cases.  
J. Bone Jt. Surg., 1991, 73b, 732-740.
  
48. **Harmand, M.F.; Bordenave, L.; Duphil, R.; Jeandot, R.; Ducassou, D.**  
Human differentiated cell cultures: "In vitro" models for characterization of cell/biomaterial interface.  
In: Christel, P.; Meunier, A. and Lee, A.J.C.(eds.),  
Biological and biomechanical performance of biomaterials.  
Elsevier science publishers B.V., 1986, 361-366.
  
49. **Harmand, M.F.; Naji, R.; Jeandot, R.; Ducassou, D.**  
Cytocompatibility study of cobalt-chromium alloys using human cell cultures.  
Advances in Biomaterials, 1990, 9, 19-24.
  
50. **Harms, H.; Mäusle, E.**  
Biokompatibilität von Implantaten in der Orthopädie.  
In: Rehn, J.; Schweiberer, L. (eds.).  
Hefte zur Unfallheilkunde.  
Springer-Verlag, 1980, 144.
  
51. **Haustveit, G.; Torheim, B.; Fystro, D.; Eidem, T.; Sandvik, M.**  
Toxicity testing of medical device materials tested in human tissue cultures.  
Biomaterials, 1984, 5, 75-80.
  
52. **Hayashi, K.; Matsuguchi, N.; Uenoyama, K.; Kanemaru, T.; Sugioka, Y.**  
Evaluation of metal implants coated with several types of ceramics as biomaterial.  
J. Biomed. Mat. Res., 1989, 23, 1247-1259.
  
53. **Haynes, D. R.; Crotti, T. N.; Haywood, M. R.**  
Corrosion of and changes in biological effects of cobalt chrome alloy and 316 L stainless steel prosthetic particles with age.  
J. Biomed. Mat. Res., 49(2), 167-175, 2000
  
54. **Heinegard, D.; Oldberg, A.**  
Glycosylated matrix proteins.  
In: Royce, P.M.; Steinmann, B. (eds.).  
Connectiv tissue and its heritable disorders.  
Wisley Liss. Inc., New York, 1993, 189-209.
  
55. **Heisig, E.**  
Leicht und verschleißfest.  
Sulzer Technical Review, 1994, 4, 4-5.



56. **Hench, L.L.; Ethridge, E.C.**  
Biomaterials - the interfacial problem.  
Adv. Biomed. Eng., 1975, 5, 35-150.
57. **Hench, L.L.; Wilson, J.**  
Surface-active biomaterials.  
Science, 1984, 226, 630-636.
58. **Hensten-Pettersen, A.; Helgeland, K.**  
Evaluation of biologic effects of dental materials using for different cell culture techniques.  
Scand. J. Dent. Res., 1977, 85, 291-296.
59. **Herrmann, F.; Schulz, G.; Lindemann, A.; Meyenburg, W.; Oster, W.; Krumwieg, D.; Mertelsmann, R.**  
Hematopoietic responses in patients with advanced malignancy treated with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.  
J. Clin. Oncol., 1989, 7, 159-167.
60. **Homsy, C.**  
Biocompatibility in selection of materials for implantation.  
J. Biomed. Mat. Res., 1970, 4, 341-356.
61. **Horowitz, S. M.; Luchetti, W. T.; Gonzales, J. B.; Ritchie, C. K.**  
The effects of cobalt chromium upon macrophages.  
J. Biomed. Mat. Res., Sep 5, 41 (3), 468-473, 1998.
62. **Howlett, C.; Evans, M.; Walsh, W.; Johnson, G.; Steele, J.**  
Mechanism of initial attachment of cells derived from human bone to commonly used prosthetic materials during cell culture.  
Biomaterials, 1994, 213-222.
63. **Hultenby, K.; Reinholt, F.P.; Norgart, M.; Oldberg, A.; Wendel, M.; Heinegard, D.**  
Distribution and synthesis of bone sialoprotein in metaphyseal bone of young rats shown a distinct different pattern from that of osteopontin.  
Eur. J. Cellbiol., 1994, 63, 230-239.
64. **Jansen, J.A.; van der Waerden, J.P.C.M.; de Groot, K.**  
Fibroblast and epithelial cell interactions with surface-treated implant materials.  
Biomaterials, 1991, 2, 25-31.

65. **Jarcho, M.; Gumaer, K.I.; Doremus, R.H.; Drobeck, H.P.**  
Tissue cellular and subcellular events at a bone-ceramic interface.  
J. Bioeng., 1977, 79-92.
66. **Jasty, M.; Bragbon, C.; Jiranek, W.; Chandler, H.; Moloney, W.; Harris, W.H.**  
Ethiology of osteolysis around porous-coated cementless total hip arthroplasties.  
Clin. Orthop., 1994, 111-126.
67. **Johnson, H.J.; Norhup, S.J.; Seagraves, P.A., Garvin, P.; Wallin, R.**  
Biocompatibility test procedures for materials evaluation in vitro.  
1. Comparative test system sensitivity.  
Journal of Biomed. Mat. Res., 1983, 17, 571-586.
68. **Jones, D.; Scholuebbbers, J-G.; Becker, M.; Matthiass, H.**  
An osteoblast-like cell culture biocompatibility test of bone compatible materials.  
Z. Zahnärztl. Implantol., 1988, 4, 290-294.
69. **Junqueira, L.C.; Carneiro, J.**  
Lehrbuch der Histologie.  
Übersetzt von T.H. Schiebler.  
Springer Verlag, 1996, 4. Auflage, 151-152.
70. **Kalla, P.; Hintz-Obertreis, P.; Wilke, A.; Griss, P.; Seiler, F.R.; Rüde, E.; Krumwieg, D.**  
Bone marrow obtained during hip surgery.  
A novel source of hemopoiesis in human long-term bone marrow culture (LTBMC).  
Behring Inst. Mitt., 1991, 90, 93-98.
71. **Kamen, P.**  
Attachment of human oral fibroblast to a granular polymeric implant for hard tissue replacement.  
Journal of Oral Implantology, 1989, 15(1), 52-56.
72. **Kaplan, S.S.; Basford, R.E.; Mora, E.; Jeong, M.H.; Simmons, R.L.**  
Biomaterial-induced alternations of neutrophil superoxide production.  
J. Biomed. Mat. Res., 1992, 26, 1039-1051.
73. **Kawahara, H.**  
Biological requirements for biomaterials.  
Implantologist, 1985, 3 (2), 41-49.

- 74. Kawahara, H.; Nakamura, M.**  
Biological testing of dental materials by means of tissue culture.  
Int. Dent. Journal, 1968, 18, 443-466.
- 75. Kawahara, H.; Shiota, J.; Yamakawa, Y.**  
Studies on the effects of dental metals upon the mesenchymal cells in tissue culture.  
Journal of the Osaka Odont. Soc., 1955, 18, 343-345.
- 76. Kienapfel, H.; Griss, P.; Orth, J.; Roloff, K., Malzer, U.**  
Zwei- bis Fünfjahresergebnisse mit der zementfrei einsetzbaren Kniegelenksendoprothese vom Typ Miller-Galante.  
Der Orthopäde, 1991, 20, 189-196.
- 77. Klötzer, W.T.**  
Grenzen der Biokompatibilitätstestung zahnärztlicher Materialien in der Zellkultur.  
Die Quintessenz, 1988, 12, 2147-2156.
- 78. Koekoenen, M.; Hormia, M.; Kivilathi, J.**  
Effects of surface processing on the attachment, orientation and proliferation of human gingival fibroblasts in vitro.  
J. Biomed. Mat. Res., 1992, 26 (10), 1325-1341.
- 79. Kotoura, Y.; Yamamuro, T.; Shikata, J.**  
A method for toxicological evaluation of biomaterials based on formation of V 79 cells.  
Archives of Orthopaedic and Traumatic Surgery, 1985, 104 (1), 15-19.
- 80. Kubo, K. et al.**  
Bioactive glass promoted formation of nodules in periodontal-ligament fibroblast in vitro.  
Journal of Biomed. Mat. Res., 1993, 27 (9), 1175-80.
- 81. Laing, P.G.**  
Clinical experience with prosthetic materials; historical perspectives, current problems and future directions.  
ASTM-STP., 1979, 684, 199-211.
- 82. Lang, H.; Kruppenbacher, J.P.; Mertens, Th.**  
Toxizität von Hydroxylapatitkeramiken auf menschliche und tierische Osteoblasten.  
Deutsche Zahnärztliche Zeitung, 1989, 44 (2), 135-137.

- 83. Lee, A.J.C.**  
Series foreword.  
In: de Putter, C.; de Lange, G.L.; de Groot, K.; Lee, A.J.C. (eds.).  
Implant Materials in Biofunction.  
Advances in Biomaterials, Elsevier Science Publishers B.V., 1988, 8.
- 84. Levert, H.**  
American Journal of Medical Science, 1829, 4, 17.
- 85. Lintner, F.; Böhm, G.; Bosch, P.; Brand, G.; Endler, M.; Zweymüller, K.**  
Is high-density polyethylene suitable as an implant material in cementfree anchoring of hip endoprostheses? A histomorphologic study of an explanted polyethylene screw-in acetabular.  
Z. Orthop., 1988, 126, 688-692.
- 86. Lintner, F.; Zweymüller, K.; Brand, G.**  
Tissue reactions to titanium endoprostheses: autopsy studies in four cases.  
J. Arthroplasty, 1986, 1, 183-195.
- 87. Lowenberg, B.; Chemecky, R.; Shiga, A.; Davies, J.**  
Mineralized matrix production by osteoblasts on solid titanium in vitro.  
Cells and Materials, 1991, 1 (3), 177-187.
- 88. Malik, M.A.; Puleo, D.A.; Bizios, R.; Doremus, R.H.**  
Osteoblasts on hydroxyapatite, alumina and bone surfaces in vitro:  
Morphology during the first 2h of attachment.  
Biomaterials, 1992, 13 (2), 123-128.
- 89. Maloney, W.J.; Jasty, M.; Rosenberg, A.; Harris, W.H.**  
Bone lysis in well-fixed cemented femoral components.  
J. Bone Jt. Surg., 1990, 72b, 966.
- 90. Maroudas, N.G.**  
Growth of fibroblasts on linear and plantar anchorages and limiting dimensions.  
Cell Research, 1973, 81, 104-110.
- 91. Mathiesen, E.B.; Lindgren, J.U.; Reinholt, F.P.; Sudmann, E.**  
Tissue reaction to wear products from polyacetal (Delrin®) and UHWMPE in total hip replacement.  
J. Biomed. Mat. Res., 1987, 21, 459-466.

- 92. Maurer, A.; Merritt, K.; Brown, S.**  
Cellular uptake of titanium and vanadium from addition of salts or fretting corrosion in vitro.  
J. Biomed. Mat. Res., 1994, 28 (2), 241-246.
- 93. Mital, M.; Cohen, J.**  
Toxicity of metal particles in tissue culture.  
J. Bone Jt. Surg., 1968, 50 A (3), 547-556.
- 94. Morscher, E.; Dick, W.**  
Cementless fixation of isoelastic hip endoprostheses manufactured from plastic materials.  
Clin. Orthop., 1983, 176, 77.
- 95. Mosmann, T.**  
A rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.  
Journal Immunol. Methods, 1983, 65, 55-63.
- 96. Murray, P. M.; Wood, M. B.**  
The results of synovitis of the wrist induced by particles of silicon debris.  
J. Bone Jt. Surg., 80(3), 397-406, 1998.
- 97. Naji, A.; Harmand M.**  
Study of the effect of the surface state on the cytocompatibility of a Co-Cr alloy using human osteoblasts and fibroblasts.  
Journal of Biomed. Mat. Res., 1990, 24, 861-871.
- 98. Niederauer, G.; McGee, T.; Keller, J.; Zaharias, R.**  
Attachment of epithelial cells and fibroblasts to ceramic materials.  
Biomaterials, 1994, 15 (5), 342-352.
- 99. Nielsen, H.K.; Jorgensen, J.O.; Brixen, K.; Moller, N.; Charles, P.; Christensen, J.S.**  
24-hour profile of serum osteocalcin in growth hormone (GH) deficient patients with and without GH treatment.  
Growth-Regul., 1991, 1 (4), 153-159.
- 100. Nuwayser, E.; Mansfield, P.; Wechezak, A.; Kahn, R.; Burkel, W.; Boatman, J.**  
Cultured linings for vascular assist devices.  
Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Org., 1973, 19, 168-174.

- 101. Ohgushi, H.; Okumura, M.; Tamai, S.**  
Marrow cell induced osteogenesis and chondrogenesis in porous calcium phosphate ceramics.  
In: Heimke, G.; Soltesz, U.; Lee, A.J.C. (eds.).  
Clinical Implant Materials,  
Advances in Biomaterials Vol. 9, Elsevier Science Publishers, B. V. Amsterdam, 1990, 225-230.
- 102. Olmo, N.; Lizarbe, M.; Turnay, J.; Müller, K.; Gavilanes, J.**  
Cell morphology, proliferation and collagen synthesis of human fibroblasts cultured on sepiolite-collagen complexes.  
J. of Biomed. Mat. Res., 1988, 22, 257-270.
- 103. Orth, J.; Trunk, J.; Griss, P.; Dörre, E.**  
Bone tissue response to pure titanium mesh with coatings of hydroxyapatite and polyethylene.  
Poster; 8th European Conference on biomaterials, September 7-9, Heidelberg 1989.
- 104. Orth, J.; Griss, P.; Falkenburg, J.; Kienapfel, H.**  
Ergebnisse nach Hemiarthroplastik des Hüftgelenkes mit Hydroxylapatit-beschichteter Titanprothese.  
In: Rehn, J. (ed.).  
Tierexperimentelle Untersuchung.  
Hefte z. Unfallheilk., Springer-Verlag Heidelberg, 1992, 613-614.
- 105. Orth, J.; Kautzmann, J.; Griss, P.**  
Bone tissue response to porous hydroxyapatite and wire meshes of stainless steel with and without coatings of hydroxyapatite and titaniumnitrite.  
In: Heimke, G.; Soltesz, U.; Lee, A.J.C. (eds.).  
Clinical Implant Materials.  
Advances in Biomaterials, Vol.9, Elsevier Science Publishers, B.V. Amsterdam, 1990, 283-287.
- 106. Orth, J.; Macedo, S.; Wilke, A.; Griss, P.**  
Osseointegration of hydroxyapatite-coated and uncoated bulk alumina implants in the femur of Göttingen mini-pigs. Mechanical testing of bonding strenght.  
In: Ravaglioli, A.; Krajewski, A. (eds.).  
Bioceramics in the human body.  
Elsevier, London, 1992, 302-307.
- 107. Orth, J.; Stenmans, G.; Kienapfel, H.**  
Bone remodelling during the first year after cementless THA with a proximally porouscoated composite stem and a Ti6Al4V stem.  
Trans. EORS., 1991, 1, 28.

- 108. Osborn, J.F.**  
Biowerkstoffe und ihre Anwendung bei Implantaten.  
Schweizerische Monatszeitschrift für Zahnheilkunde, 1979, 89, 1138-1139.
- 109. Osborn, J.F.**  
Hydroxylapatitkeramik-Granulate und ihre Systematik.  
Zahnärztliche Mitteilungen, 1987, 77, 840-852.
- 110. Osborn, J.F.**  
Die biologische Leistung der Hydroxylapatitkeramik-Beschichtung auf dem Femurschaft einer Titanendoprothese. Erste histologische Auswertung eines Humanimplantates.  
Biomed. Techn., 1987, 32, 177.
- 111. Osborn, J.F.**  
Implantatwerkstoff Hydroxylapatit: Grundlagen und klinische Anwendung.  
Quintessenz-Verlag, 1985, 127-140.
- 112. Oster, M.; Friedenstein, A.J.**  
Stromal stem cells: marrow derived osteogenic precursors.  
In: Evered D., Harnett, S. (eds.).  
Cell and molecular biology of vertebrate hard tissues.  
Ciba Foundation Symposium 136, Wiley, Chester, 1988, 42-53.
- 113. Owen, M.E.; Triffitt, J.T.; Bennett, J.H.**  
Cells with osteogenic potential.  
BIOSIS-International society for Bio-analoging Skeletal Implants.  
Annual Meetings, Montreux, 1990, 51-56.
- 114. Pappas, A.; Cohen, J.**  
Toxicity of metal particles in tissue culture.  
J. Bone Jt. Surg., 1968, 50 A (3), 535-546.
- 115. Pizzoferrato, A.; Ciapetti, G.**  
Human lymphocytes (3H) thymidine uptake test for evaluation of allo-plastic material biocompatibility.  
Ceramics in surgery, Elsevier Scientific Publ. Co., Amsterdam, 1983, 137-148.
- 116. Pizzoferrato, A.; Vespucci, A.; Ciapetti, G.; Stea, S.**  
Biocompatibility testing of prosthetic implant materials by cell cultures.  
Biomaterials, 1985, 6(5), 346-351.

- 117. Powell, D.; Lawrence, W.; Turner, J.; Autian, J.**  
Development of a toxicity evaluation program for dental materials and products.  
1. screening for irritant responses.  
J. Biomed. Mat. Res., 1970, 4, 583-596.
- 118. Puleo, D.; Holleran, L.; Doremus, R.; Bizios, R.**  
Osteoblast response to orthopaedic implant materials in vitro.  
Journal of Biomedical Mat. Res., 1991, 25, 711-723.
- 119. Puleo, D.; Preston, K.; Shaffer, J.; Bizios, R.**  
In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay.  
Biomaterials, 1993, 14 (5), 359-364.
- 120. Rae, T.**  
A study on the effects of particulate metals of orthopaedic interest on murine macrophages in vitro.  
J. Bone Jt. Surg., 1975, 444-450.
- 121. Rahn, B.A.**  
Knochengewebe  
In: Drenckhahn, D. (ed.).  
Benninghoff Anatomie Band I.  
Verlag Urban und Schwarzenberg, 1994, 145.
- 122. Rappaport, H.; Lilly, G.; Kapsimalis, P.**  
Toxicity of endodontic filling materials.  
Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology, 1964, 31, 785-802.
- 123. Ratner, B.; Horbett, T.; Hoffmann, A.; Hauscka, S.**  
Cell adhesion to polymeric materials: Implications with respect to biocompatibility.  
J. Biomed. Mat. Res., 1975, 9, 407-422.
- 124. Rosso, R. et al.**  
Five-year review of the isoelastic RM total hip endoprosthesis.  
Arch. Orthop. Trauma Surg., 1988, 107, 86-88.
- 125. Rout, P.; Tarrant, S.; Frame, J.; Davies, J.**  
Interaction between primary bone cell culture and biomaterials Part 3: A comparison of dense and macroporous hydroxyapatite.  
Biomaterials and Clinical Science, 1987, 591-596.



- 126. Santavirta, S.; Hoikka, V.; Eskola, A.; Konttinen, Y.T.; Paavilainen, T.; Tallroth, K.**  
Aggressive granulomatous lesions in cementless total hip arthroplasty.  
J. Bone Jt. Surg., 1990, 72b, 980.
- 127. Santavirta, S.; Konttinen, Y.T.; Bergroth, V.; Eskola, A.; Tallroth, K.; Lugholm, T.B.**  
Aggressive granulomatous lesions associated with hip arthroplasty immuno-pathologic studies.  
J. Bone Jt. Surg., 1990, 72a, 252.
- 128. Sarmiento, A.; Gruen, T. A.**  
Radiographic analysis of a low modulus titanium alloy femoral total hip component.  
J. Bone Jt. Surg., 1985, 67a, 48-56.
- 129. Sarmiento, A.; Natarajan, V.; Gruen, T. A.; Macmahon, M.**  
Radiographic performance of two different total hip cemented arthroplastics.  
Orthop. Clin. North. Am., 1988, 19, 505.
- 130. Schmidt, M.**  
Technische Information "Sauerstoff-Diffusionshärtung; Tribosul™-ODH"  
Sulzer Orthopädie AG, 1996, Lit.No. 2028 d.
- 131. Semlitsch, M.**  
Metallische Werkstoffe für Implantate.  
In: H. Rettig (ed.).  
Biomaterialien und Nahtmaterialien.  
Springer-Verlag, 1984, 107-111.
- 132. Semlitsch, M.; Weber, H.; Steger, R.**  
Fifteen years of experience with a Ti6Al-7Nb alloy for joint replacements.  
Biomedizinische Technik, 1995, 40-12, 347-355.
- 133. Semlitsch, M.; Weber, H.; Streicher, R.M.; Schön, R.**  
Joint replacement components made of hot-forged and surface-treated Ti-6Al-7Nb alloy.  
Biomedizinische Technik, 1991, 36-5, 112-119.
- 134. Serre, C.M.; Delmas, P.D.**  
Biocompatibility between bone and prosthetic implants.  
BIOSIS-International society for Bio-analoging Skeletal Implants.  
Annual Meetings, Montreux, 1990, 81-88.

- 135. Sherman, S.S.; Jordan, D.T.; Hollis, B.W.; Gundberg, C.M.; Roy, T.A.; Plato, C.C.**  
Biochemical parameters associated with low bone density in healthy men and women.  
J. Bone Min. Res., 1992, 7 (10) , 1123-1130.
- 136. Streicher, R.M.**  
Testing of UHMWPE as a material for implants: Results and conclusions.  
In: Buchhorn, G.H.; Willert, H.G. (eds.).  
Technical principles, design and safety of joint implants.  
Hogrefe and Huber Publishers, 1994, 53-59.
- 137. Streicher, R.M.**  
Tribologie in der Medizin: Prüfung und Optimierung von Materialpaarungen für Endoprothesen.  
Sulzer Medizinaltechnik AG, 1993.
- 138. Stutzmann, J.; Petrovic, A.; Tanzer, M.; Maloney, W.J.; Jasty, M.; Harris, W.H.**  
The progression of femoral cortical osteolysis in association with total hip arthroplasty without cement.  
J. Bone Jt. Surg., 1992, 74a, 404.
- 139. Stutzmann, J.; Petrovic, A.**  
Bone cell histiogenesis. The skeletoblast as a stem cell for preosteoblasts and for secondary type prechondroblasts.  
In: Liss, A.R. (ed.).  
Factors and mechanisms influencing bone and growth.  
New York, 1982, 29-42.
- 140. Taylor, J.; Abodeely, R.; Fuson, R.**  
Rapid screening of biomedical polymers by two methods of tissue culture.  
Amer. Soc. Artif. Int. Organs, 1973, 19, 175-178.
- 141. Teti, A.; Tarquilio, A.; Grano, M.; Colucci, S.; Laforgia, A.; Mangini, F.; Zambonin, A.**  
Effects of calcium-phosphate-based materials on proliferation and alkaline phosphatase activity of newborn rat periosteal cells in vitro.  
J. Dent. Res., 1991, 70 (6), 997-1001.
- 142. Thomson, L.; Law, F.; James, K.; Rushton, N.**  
Biocompatibility of particles of Gore-Tex cruciate ligament prosthesis: an investigation both in vitro and vivo.  
Biomaterials, 1991, 12 (8), 781-785.

- 143. Uchida, A.; Nade, S.; McCartney, E.; Ching, W.**  
Growth of bone marrow cells on porous ceramics in vitro.  
J. Biomed. Mat. Res., 1987, 1-10.
- 144. Visuri, T.; Koskenvuo, M.**  
Cancer risk after Mc Kee-Farrar total hip replacement.  
Orthopedics, 14, 137-142, 1991.
- 145. Walter, A.; Plitz, W.**  
Studies on the tribology and deformation behaviour of UHWMPE.  
In: Willert, H. G.; Buchhorn, G. H.; Eyerer, P. (Hrsg.),  
Ultra-high molecular weight polyethylene as biomaterial in orthopaedic surgery.  
Hogrefe and Huber Publishers, 41-49, 1991.
- 146. Weinstein, R.S.; Gundberg, C.M.**  
Serum osteocalcin levels reflect bone mineralisation in osteopenic patients.  
Clin. Res., 1983, 31, 1981-1983.
- 147. Weiss, R.E.; Reddy, A.H.**  
Appearance of fibronectin during the differentiation of cartilage, bone and bone marrow.  
J. Cell Biol., 1981, 88, 630-636.
- 148. Welker, D.; Neupert, G.; Gehre, G.**  
Untersuchung zur Gewebeverträglichkeit dentaler Nickel-Chrom-Legierungen anhand rasterelektronischer Studien der Morphogenese von Zellkulturen bei Direktkontakt.  
Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde mit Zentralblatt, 1983, 71 (4), 358-364.
- 149. Wennberg, A.; Hasselgren, G.; Tronstad, L.**  
A method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on millipore filters.  
J. Biomed. Mat. Res., 1979, 13, 109-120.
- 150. Wilke, A.; Ahmed, M.; Nagel, R.-Th.; Fuhrmann, R.; Griss, P.; Franke, R.P.**  
Production of collagens type I and III in human bone marrow cultures.  
Fifth World Biomaterials Congress, Toronto, Canada,  
May 29- June 2, 1996.
- 151. Wilke, A.; Orth, J.; Griss, P.**  
Development of a human marrow cell culture to test the cytocompatibility of bulk hydroxyapatite materials.  
Proceedings of the Int. Congress on Bioceramics and the Human Body held in Faenza, Italy, April 1991.

- 152. Wilke, A.; Orth, J.; Griss, P.; Nehls, V.; Drenckhahn D.**  
Development of the human bone marrow cell culture to test the cytocompatibility of bulk hydroxyapatite materials.  
In: Ravaglioli, A.; Kijewsky, A. (eds.).  
Bioceramics and the human body.  
Elsevier London, 1992, 471-476.
- 153. Wilke, A.; Orth, J.; v. Hirschheydt, S.; Lomb, M.; Schröder, G.; Griss, P.; Franke, P.**  
Standard testing method of biocompatibility for different biomaterials by the aid of a human bone marrow cell culture.  
Trans., 2nd annual conference of the European Orthopaedic Research Society, September, Varese, 1992, 50, 27-30.
- 154. Wilke, A.; Orth, J.; Kienapfel, H.; Schröder, G.; Griss, P.**  
Sensitivity of a human bone marrow cell culture to test the biocompatibility of different biomaterials.  
Trans. 4th World Biomaterial Congress, April 24.-28.  
Berlin, 1992, 162.
- 155. Wilke, A.; Orth, J.; Kraft, M.; Griss, P.**  
Bone ingrowth behaviour of hydroxyapatite-coated, polyethylene-intruded and uncoated, sandblasted pure titanium implants in an infected implantation site: an experimental study in miniature pigs.  
Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1993, 4, 260-265.
- 156. Wilke, A.; Orth, J.; Kraft, M.; Griss, P.; Franke, R.P.**  
Standardisiertes Infektmodell zur Untersuchung des knöchernen Einwachsverhaltens Hydroxylapatit-beschichteter Reintitangitternetze am Schweinefemur.  
Z. Orthop., 1993, 131, 370-376.
- 157. Wilke, A.; Schröder, G.; Orth, J.; Griss, P.; Franke, R.P.**  
Biokompatibilitätsprüfung von Implantatmaterialien mit humanen Knochenmarkszellkulturen.  
Biomed. Tech., 1993, 126-129.
- 158. Wilke, A.; v. Hirschheydt, S.; Orth, J.; Kienapfel, H.; Griss, P.; Franke, R.P.**  
Die humane Knochenmarkszellkultur- eine sensitive Methode zur Beurteilung der Biokompatibilität von Materialien, die in der Orthopädie verwendet werden.  
Z. Orthop., 1994, 132, 1-7.

- 159. Wilke, A.; Orth, J.; Lomb, M.; Fuhrmann, R.; Kienapfel, H.; Griss, P.; Franke, R.P.**  
Biocompatibility analysis of different biomaterials in human bone marrow cell cultures.  
J. Biomed. Mat. Res., 40, 301-306, 1998
- 160. Wilke, A.; Landgraff, M.; Orth, J.; Poenitz, H.; Kienapfel, H.; Boelte, K.; Griss, P.; Franke, R. P.**  
Human bone marrow cell culture: A sensitive method for determination of the biocompatibility of implant materials.  
Atlanta, (27), 137-151, 1999.
- 161. Willert, H.G.; Bertram, H.; Buchhorn; G.H.**  
Osteolysis in alloarthroplasty of the hip. The role of ultra high molecular weight polyethylene wear particles.  
Clinical Orthopaedics, 1990, 95-107.
- 162. Willert, H.G.; Buchhorn, G.**  
Biologische Testung von Biomaterialien.(Empfehlung des Arbeitskreises Biomaterial der DGOT).  
Z. Orthop., 1979, 117, 671-683.
- 163. Willert, H.G.; Buchhorn, G.; Prüßner, P.**  
Aussagewert biologischer Tests im Rahmen der Überprüfung von Biomaterialien.  
Symposium über Biomaterialien.  
Schriftreihe Med. Orthop. Techn., 1981, 5, 23-38.
- 164. Willert, H.G.; Semlitsch, M.; Buchhorn, G.; Kriete, U.**  
Materialverschleiß und Gewebereaktion bei künstlichen Gelenken.  
Der Orthopäde, 1978, 7, 62-67.
- 165. Williams, D.F.**  
Consensus and definitions in biomaterials.  
In: de Putter, C.; de Lange, G.L.; de Groot, K.; Lee, A.J.C. (eds.).  
Implant Materials in Biofunction.  
Advances in Biomaterials, Elsevier Science Publishers B.V., 1988, 8, 11-16.
- 166. Williams, D.F.**  
Orthopedic implants: Fundamental principles and the significance of biocompatibility.  
Chapter 1 in: Williams, D.F. (ed.).  
Biocompatibility of orthopaedic implants.  
CRC Series in Biocompatibility, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1982.

- 167. Wilsnack R.; Meyer, F.; Smith, J.**  
Human cell culture toxicity testing of medical devices and correlation to animal tests.  
Biomaterials Med. Dev. Art. Org., 1973, 1 (3), 543-562.
- 168. Winter, M.; Griss, P.; de Groot, K.; Tagai, H.; Heimke, G.; van Dijk, H.J.A.; Sawai, K.**  
Comparative histocompatibility testing of seven phosphate ceramics.  
Biomaterials, 1981, 2, 159-160.
- 169. Wong, G.G.; Wittek, J.S.; Temple, P.A.; Wilkes, K.M.; Leary, A.C.; Luxemberg, D.P.; Jones, S.S.; Brown, E.L.; Kay, R.M.; Orr, E.C.**  
Human GM-CSF: molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins.  
Science, 1985, 228, 810.
- 170. Young, M.F.; Ibaraki, K.; Kerr, J.M.; Heegaard, A.M.**  
Molecular and cellular biology of the major non collagenous proteins in bone.  
In: Noda, M. (ed.).  
Cellular and molecular biology of the bone.  
Academic Press Inc., New York, 1993, 193-200.

## **Anhang**

Die im Teil Material und Methoden Kapitel 2.4. beschriebene Entnahme und Verwendung des Knochenmarks ist durch die Ethikkommission genehmigt (Aktenzeichen AZ 4/97).

## **Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg

Amon, Arnold, Aumüller, Basler, Bauer, Baum, Berger, Bien, Braasch, Doss, Drenckhahn, Emons, Engel, Eschenbach, Fruhsdorfer, Fuhrmann, Ganz, Gemsa, Geus, Göke, Golenhofen, Gottesbüren, Gotzen, Gressner, Griss, Grezschik, Habermehl, Happle, Havemann, Hilgermann, Hoffmann, Huffmann, Joseph, Jungclas, Kaffarnik, Kern, Kleine, Kleinsasser, Klose, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuni, Lange, Lauer, Lennartz, Lorenz, Maisch, Mannheim, Mennel, Moosdorf, Netter, Neurath, Peter, Pfab, Pohlen, Radsak, Remschmidt, Riedmiller, Röhm, Rothmund, Rupec, Schachtschabel, Schmidt-Rhode, Schmitz-Moormann, Schneider, Schüffel, Schulz, Schwerk, Seybert, Slenczka, Sturm, Thomas, Unsicker, Voigt, von Wichert, Wagner, Wiegand, Zelder.



## **Danksagung**

Bedanken möchte ich mich zunächst bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. Axel Wilke für seine über die Jahre anhaltende Unterstützung , seine Hilfsbereitschaft, seine Geduld bei der Anfertigung dieser Arbeit und schließlich für die Erstellung des Referates.

Weiterer Dank gilt den Mitarbeiterinnen des Labors für experimentelle Orthopädie, besonders Frau Marita Kratz.

Ohne ihre Unterstützung, ihr Wissen und ihre ständige Hilfsbereitschaft wäre die Fertigstellung dieser Arbeit wohl kaum möglich gewesen.

Ebenfalls möchte ich der ehemaligen Behringwerke AG danken für die technische Unterstützung, insbesondere Frau Claudia Mahlberg und Frau Karin Frank, sowie Herrn Armin Trautwein für die freundliche Einarbeitung am FACS-Gerät.

Abschließender Dank gebührt meinen Eltern und all den Freunden, insbesondere meiner Frau Katrin, die mir in der Zeit der Erstellung dieser Arbeit zur Seite gestanden haben und immer für mich da waren, wenn ich sie gebraucht habe.